

Eiseniapore - ein dem Komplementprotein C9 analoges porenformendes Hämolyisin aus Anneliden:  
Charakterisierung der Membranwechselwirkung und  
Identifizierung des molekularen Targets.

**PDF-Version**



Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Pädagoge Sven Lange  
geb. am 30.09.1965  
in Dresden

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. H. Meyer

Dekanin der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. V. Bonacic-Koutecky

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. Herrmann  
2. Prof. Dr. R. Lucius  
3. Prof. Dr. W. Mohrig

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.1998

## **Zusammenfassung**

### **Lange, Sven: Eiseniapore - ein dem Komplementprotein C9 analoges porenformendes Hämolyisin aus Anneliden: Charakterisierung der Membran-wechselwirkung und Identifizierung des molekularen Targets.**

Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie/Biophysik, Dissertation.

Ein wirksames Immunsystem erfordert das Zusammenspiel von zellulären und humoralen Komponenten, die sich in den frühen Lebensphasen der Organismen entwickeln. Die meisten Zellen, die in die Immunantwort involviert sind, leiten sich aus Stammzellen des Knochenmarks ab. Deshalb wurde bei Organismen ohne Endoskelett - den Invertebraten - keinerlei Fähigkeiten zu Immunreaktionen angenommen. Der Evolutionserfolg der Invertebraten zeigt jedoch, daß sie in der Lage sind, sich pathogenen Keimen und Parasiten erfolgreich zu widersetzen. Markant für viele immunologische Prozesse in Invertebraten ist die äußerst starke Erstreaktion (Humphreys und Reinherz, 1994). Die vorgelegte Untersuchung wurde an einer nicht induzierbaren, sondern natürlichen vorkommenden Erstreaktion (lytischen Aktivität) durchgeführt. Die Analyse des lytischen Prozesses schloß neben der Isolierung und Charakterisierung eines Hämolyisins (Eiseniapore) aus *Eisenia fetida fetida* und eines Eiseniapore-regulierenden Faktors (ERF) - einem hier erstmals nachgewiesenen Hämolyisin-Regulator bei Invertebraten - die Aufklärung der Eiseniapore-Membran-Wechselwirkung an Lipidmembranen ein. Hierbei bildeten Leakage-messungen an Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung einen experimentellen Schwerpunkt. Diese Messungen ermöglichten zum einen die Identifizierung des Lipidrezeptors Sphingomyelin, der die Bindung Eiseniapores an der Targetmembran vermittelt, und zum anderen geben sie einen Hinweis auf eine spezielle Wechselwirkung von Sphingomyelin mit Cholesterol. Die Einteilung tierischer Toxine erfolgt nach Bernheimer (1996) in einer ersten Grobansprache in Sphingomyelin-inhibierbare und in Thiol-aktivierbare Proteine. Eiseniapore ist das erste beschriebene Toxin, daß sich in diese dichotome Ordnung nicht einteilen läßt, da es durch Thiolgruppen aktiviert werden kann und außerdem durch Sphingomyelin inhibierbar ist. Trotz der Fähigkeit der unmittelbaren Erkennung ohne vorherigen Kontakt gelten die Immunantworten der meisten Invertebraten als sogenannte 'langsame Immunreaktionen' (Humphreys und Reinherz, 1994). Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Leakagemessungen werden zum ersten Mal sehr schnelle Reaktionen bei Anneliden beschrieben. Die Kinetik des Leakagevorgangs folgt einer Reaktion 2. Ordnung, woraus geschlossen werden kann, daß Eiseniapore an einem Punkt des Leakageprozesses als Dimer agiert. Die Sekundärstruktur Eiseniapores erfährt während der Membranbindung keine signifikante Änderung: 37%  $\beta$ -sheet, 28%  $\alpha$ -helix, 17%  $\beta$ -turn und 18% Zufallsknäuel. Somit gehört Eiseniapore zu den wenigen membranaktiven Toxinen mit einem hohen Anteil an  $\beta$ -sheet Strukturen, einer Gruppe von Proteinen,

über die im Gegensatz zu den  $\alpha$ -helikalen Proteinen nur sehr wenig Informationen vorliegen (van der Goot et al., 1997). Durch Elektronenmikroskopie und Elektrophorese wurde die eigentliche lytische Struktur an der Targetmembran identifiziert. Es ist eine Proteinpore, bestehend aus sechs Eiseniapore-Monomeren, die einen Tunnel in der Membran bilden, der anderen Porenformern (Komplement) gleicht. Da lytische Proteine für viele Organismen beschrieben werden konnten, wurde für die Klassifikation der gewonnenen Details untersucht, ob die membrandestabilisierenden Vorgänge jeweils analog oder homolog zu denen anderer lytischer Proteine sind. Für die lytische Aktivität in *E. fetida* ssp. wurde bisher eine Analogie (funktionsgleiche Struktur) zu lytischen Proteinen des Komplementsystems verneint (Roch et al., 1995). Die vorgelegten Ergebnisse zeigen jedoch, daß es für die Annahme einer Analogie von Eiseniapore mit dem lytischen Komplex des Komplements zahlreiche Anhaltspunkte gibt. Ein Indiz für die immunologische Verwandtschaft von Eiseniapore mit der Komplementkomponente C9 und des ERF mit dem Komplementregulator Vitronectin ist neben der gezeigten Kreuzreaktionen der Nachweis, daß der ERF neben der Eiseniapore- auch die Komplement-vermittelte Hämolyse inhibiert, wie auch Vitronectin die Eiseniapore- und die Komplement-induzierte Hämolyse unterdrückt. Dies demonstriert erstmals die Funktionsähnlichkeit lytischer Proteine aus den Stämmen Oligochaeta und Mammalia.

Before ordering a test decide what you will do if it is 1. positive, or 2. negative.

If both answers the same, don't do the test.

D. Greenberg (1880-1958, Biochemiker)

Diese Arbeit wurde von der *Friedrich-Naumann-Stiftung, Wissenschaftliche Dienste und Begabtenförderung* mit Mitteln des *Bundesministeriums für Bildung und Wissenschaft* gefördert.

# Inhalt

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>I</b>  |
| <b>2. Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| 2.1. Immunreaktion bei Invertebraten.....   | 1         |
| 2.2. Abwehrreaktionen bei Anneliden am Beispiel der Lumbriciden<br>(Regenwürmer)..... | 9         |
| 2.3. Membran-Wechselwirkungen lytischer Proteine.....                                 | 15        |
| <b>3. Material und Methoden.....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1. Hälterung der Anneliden und Gewinnung der Cölomflüssigkeit.....                  | 22        |
| 3.2. Gewinnung und Verwendung der Erythrozyten.....                                   | 22        |
| 3.3. Präparative Elutions-Polyacrylamidgelelektrophorese.....                         | 23        |
| 3.4. Isolierung des Vitronectins (synonym: S-Protein).....                            | 24        |
| 3.5. Analytische Polyacrylgelamidelektrophorese.....                                  | 24        |
| 3.6. Monospezifische Antiseren.....   | 25        |
| 3.7. Liposomenpräparation.....  | 25        |
| 3.8. Präparation von geschlossenen (resealed) Ghosts and Nanoerythrocyten.....        | 26        |
| 3.9. Leakage-Assay.....   | 27        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.10. Hämolyse Assay.....   | 27        |
| 3.11. Charakterisierung von membranbindungs- und lytischer Aktivität von Eiseniapore.....                                   | 29        |
| 3.12. Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz.....  | 30        |
| 3.13. Elektronenmikroskopie.....  | 30        |
| 3.14. Circular dichroismus/CD-Spektroskopie.....  | 31        |
| 3.15. Osmotische Experimente.....   | 31        |
| 3.16. Immunoblot-Analyse (Westernblot).....   | 32        |
| 3.17. ESR Messungen.....  | 32        |
| 3.18. Sequenzierung Eiseniapores.....   | 33        |
| <b>4. Ergebnisse.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.1. Reinigung und Charakterisierung eines hämolytischen Proteins aus der Cölomflüssigkeit <i>E. f. fetidas</i>.....</b> | <b>36</b> |
| 4.1.1. Die Isolation des hämolytischen Faktors mittels präparativer Elektrophorese zeigt ein 38 kDa Protein.....            | 36        |
| 4.1.2. Sequenzdaten Eiseniapores nach Spaltung mit einer Endopeptidase.....   | 37        |
| 4.1.3. Die Interaktion Eiseniapores mit Erythrozyten verursacht Agglutination und Lyse.....                                 | 38        |
| 4.1.4. Charakterisierung der hämolytischen Aktivität von Eiseniapore.....   | 40        |
| 4.1.5. Der Einfluß von Kohlenhydraten auf die hämolytische und  |           |

|  |           |
|--|-----------|
| hämagglutinierende Aktivität von Eiseniapore ist ein Hinweis auf den Lektincharakter.....  | 43        |
| 4.1.6. Die zwei schritte der lytischen Wirkung Eiseniapore: die temperatur-unabhängige Bindung und die temperaturabhängige lytische Aktivität..... | 45        |
| <b>4.2. Interaktion von Eiseniapore mit Modellmembranen.....</b>   | <b>47</b> |
| 4.2.1. Eiseniapore induziert einen Leakage von Liposomen.....  | 47        |
| 4.2.2. Die ultrastrukturelle Analyse der Eiseniapore-induzierten Membranläsion demonstriert die porenbildende Fähigkeit dieses Proteins.....       | 56        |
| 4.2.3. Wie groß ist der effektive Durchmesser des Eiseniapore-Kanals in biologischen Membranen?.....   | 59        |
| 4.2.4. Vergleichende Untersuchungen der Interaktion von Eiseniapore mit Erythrozyten, geschlossenen Ghosts und Nanoerythrosomen.....               | 60        |
| 4.2.5. Eiseniapore bindet im Gegensatz zu lytischen Peptiden an der Membran irreversibel.....  | 64        |
| 4.2.6. Welche molekularen Komponenten Sphingomyelins sind für den Leakage essentiell?.....   | 68        |
| 4.2.7. Die Struktur von membranassoziiertem Eiseniapore.....   | 71        |
| <b>4.3. Die Regulation der lytischen Aktivität.....</b>  | <b>74</b> |
| 4.3.1. Isolation und Charakterisierung eines Eiseniapore-regulierenden Faktors (ERF) aus der Cölomflüssigkeit von Anneliden.....                   | 74        |
| 4.3.2. Die Reinigung dem ERF funktional ähnlicher Proteine aus der   |           |



|  |           |
|--|-----------|
| Cölofluidität verschiedener europäischer Lumbriciden.....  | 76        |
| 4.3.3 Präparation Vitronectins/S-Proteins und der Nachweis seiner funktionalen Integrität.....   | 77        |
| 4.3.4. Die Hämolyseregulatoren aus dem Säuger und den Oligochaeten sind funktionell austauschbar.....  | 78        |
| 4.3.5. Heparin beeinflusst die inhibitorische Aktivität des Eisenipore-regulierenden Faktors.....  | 79        |
| 4.3.6. Eisenipore/ERF und Komplement/Vitronectin sind analoge Proteingruppen - lytische Aktivitäten in der Anwesenheit der Regulatorproteine und Antikörper..... | 80        |
| 4.3.7. Immunologisch homologe Komponenten bei Säugern und Invertebraten - Analyse mittels Immunoblotting.....  | 82        |
| <b>5. Diskussion.....</b>  | <b>85</b> |
| 5.1. Die humorale Abwehr bei Invertebraten.....  | 85        |
| 5.2. Natürliche Killer-Zellen als Vermittler zytolytischer Reaktionen.....   | 87        |
| 5.3. Isolierung und Charakterisierung von Eisenipore.....  | 88        |
| 5.4. Eisenipore induziert über einen Lipid-Rezeptor einen Leakage von Liposomen.....   | 91        |
| 5.5. Existiert neben dem Lipid-Rezeptor zusätzlich ein Protein- oder Kohlenhydrat-Rezeptor für Eisenipore?.....  | 97        |
| 5.6. Strukturelle Eigenschaften von Eisenipore.....  | 100       |

|  |            |
|--|------------|
| 5.7. Wie schützt sich <i>Eisenia fetida fetida</i> vor der lytischen Aktivität Eiseniapores?.....  | 103        |
| 5.8. “Warum so kompliziert?”.....  | 105        |
| 5.9. Die Aktivität Eiseniapores wird durch Kohlenhydrate beeinflusst.....  | 107        |
| 5.10. Eiseniapore - das erste nachgewiesene $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige lytische Lektin.....   | 110        |
| 5.11. Die hämolytische Aktivität von Eiseniapore wird durch einen Regulator inhibiert.....   | 111        |
| 5.12. Eiseniapore und dessen Regulator (ERF) sind immunologisch verwandt mit der Komplementkomponente C9 und dessen Regulator Vitronectin..... | 116        |
| 5.13. Zusammenfassende Betrachtung der eigenen Ergebnisse an Hand der diskutierten Unterarten <i>Eisenia fetidas</i> .....                     | 120        |
| <b>6. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>128</b> |
| <b>7. Anhang.....</b>  | <b>163</b> |

Danksagung

Lebenslauf

Tagungsbeiträge und Publikationen

Selbständigkeitserklärung

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| ANTS           | 8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure        |
| a.u.           | willkürliche Einheiten                        |
| CAPS           | 3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure       |
| CD             | Circulardichroismus                           |
| Chol           | Cholesterol                                   |
| Da             | Dalton, Molgewichtseinheit (g/mol)            |
| DPX            | p-Xylen-bis-pyridiumbromid                    |
| EDTA           | Ethylendiamintetracetat                       |
| EGTA           | Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)  |
| EM             | Elektronenmikroskopie                         |
| ESR            | Elektronenspinresonanz                        |
| G              | Gauss   |
| GA             | Ganglioside (Typ IV)                          |
| HPLC           | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie     |
| L/P            | molares Lipid zu Protein Verhältnis (mol/mol) |
| LUV            | große unilamellare Vesikel                    |
| lyso-PC        | lyso-Phosphatidylcholin                       |
| MAC            | Membranangriffskomplex                        |
| MW             | Molekulargewicht                              |
| PAGE           | Polyacrylamidgelelektrophorese                |
| RBC            | rote Blutzellen                               |
| PBS            | Phosphatpuffer                                |
| PC             | Phosphatidylcholin                            |
| PE             | Phosphatidylethanolamin                       |
| PEG            | Polyethylenglykol                             |
| PS             | Phosphatidylserin                             |
| $\Theta_{MRW}$ | molare Elliptizität                           |
| RP             | Umkehrphasen-Säule                            |
| rpm            | Umdrehungen pro Minute                        |
| RT             | Raumtemperatur                                |
| SDS            | Na-Dodecylsulfat                              |
| SM             | Sphingomyelin                                 |

|      |  |
|------|--|
| SUV  | kleine unilamellare Vesikel                            |
| TCR  | T-Zell-Rezeptor  |
| TEM  | Transmissions-Elektronenmikroskopie                    |
| Tes  | N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure |
| TFA  | Trifluoressigsäure                                     |
| Tris | Tris[hydroxymethyl]aminomethan                         |

## 2. EINLEITUNG

### 2.1. Immunreaktionen bei Invertebraten<sup>1</sup>

'Wer einmal an der Pest erkrankt ist, infiziert sich nie wieder.' Entweder der Mensch stirbt oder ist sein Leben lang frei von dieser Infektion. In beiden Fällen bleibt die Erkrankung ein singuläres Ereignis. Diese mittelalterliche Beobachtung wurde mit dem Begriff Immunität (lat. immunis - frei von) versehen. Schon zum Ende des vergangenen Jahrhunderts weitete Metschnikoff 1879 mit Studien über das Abwehrverhalten von Seesternlarven die Immunologie auf den Bereich der Wirbellosen (Invertebraten) aus. Burnet und Fenner wiesen 1949 darauf hin, daß sämtliche Organismen mit tierischer Ernährung notwendigerweise die Fähigkeit zur "Fremderkennung" besitzen müssen, um selbst synthetisierte von aufgenommenen Molekülen zu unterscheiden.

Die Fremderkennung wird bei Mäusen<sup>2</sup> und Menschen, den immunologisch am besten untersuchten Organismen, vor allem über Antikörper (Immunoglobuline) und T-Zell-Rezeptoren (TCR) vermittelt. Die TCR - als antikörperähnliche Proteine auf der Membranoberfläche der T-Zellen - werden jedoch im Gegensatz zu den Antikörpern nicht sezerniert. Die T-Zell-Immunantwort wird direkt auf der Membranoberfläche der

---

<sup>1</sup> Die Definition der Immunität als Fähigkeit eines Organismus, Krankheiten zu widerstehen, folgt der erweiterten Definition von Götz (1988). Diese verzichtet bewußt auf eine Einteilung in: *Resistenzmechanismen* für Wirbellose und *Immunreaktionen* nur für Wirbeltiere. Die Einteilung wird insbesondere außerhalb des angelsächsischen Sprachraums häufig noch vorgenommen (Friemel und Brock, 1990).

<sup>2</sup> Die Immunologie bildete sich historisch als Zweig der Medizin heraus, da das Objekt der Medizin -der Mensch- Experimenten nicht zur Verfügung stand, wurden Tiermodelle gesucht; so stammen heute Theorie, Konzept und Technik der Immunologie hauptsächlich aus der wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit einer einzigen Wirbeltierart - *Mus musculus* (Hausmaus). Die Resultate, die an der Maus gewonnen wurden, lassen sich nur an anderen Säugern verifizieren. Die Abwehrmechanismen von über 95% aller Organismen (den Wirbellosen) sind darum nur in geringem Maße aufgeklärt (Cooper et al., 1992).

T-Zelle über den Rezeptor ausgelöst. Die T-Zellen sind die Träger der zellulären Immunantwort. Die humorale Immunantwort (siehe auch Kap. 2.2 und *Diskussion*) wird im wesentlichen über Antikörper vermittelt, auch wenn sich die humorale Immunantwort nicht auf Antikörper reduzieren läßt. Die Antikörper der höheren Säugetieren lassen sich in fünf Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) mit jeweils typischen physikochemischen Eigenschaften einteilen. In einem Milliliter Humanblut zirkulieren ständig  $10^{16}$  Antikörper (Friemel und Brock, 1990). Diese haben eine primär neutralisierende Wirkung auf eindringende Keime wie Viren und bakterielle Toxine. Aber sie wären nahezu bedeutungslos, wenn sich ihre Wirkung gegen fremde, immunogene Moleküle (= Antigene) nicht auf sekundäre Effektorfunktionen erweitern würde. Die Aktivierung des Komplement (Es *komplementiert* die Wirkung der Antikörper.) ist einer der wichtigsten solcher Effektormechanismen. Das Komplement ist kein einzelnes Protein, sondern es besteht aus einer Gruppe von ungefähr 20 Proteinen, die sich kaskadenartig aktivieren und so Entzündungsreaktionen vermitteln, in deren Folge fremde Zellen und Bakterien lysiert werden können (Colten und Rosen, 1992; Tayler, 1992; Schieren und Hänsch, 1993; Nicholson-Weller und Halperin, 1993; Green und Vermeulen, 1994; Tschopp und French, 1994; Birmingham, 1995; Lokki et al., 1995)<sup>3</sup>. Die proinflammatorischen und lytischen Eigenschaften des Komplements erfordern eine strenge Regulation. Die terminalen lytischen Komponenten werden unter anderem durch den homologen Restriktionsfaktor (HRF) und Vitronectin reguliert. Vitronectin kann an mehreren Orten der Komplementkaskade wirken, so unterdrückt es beispielsweise die Polymerisation von C9-Monomeren zur makromolekularen Pore. Vitronectin ist vermutlich das phylogenetisch ältere Regulatorprotein, da es im Gegensatz zum HRF auch die hämolytische Aktivität von Perforin inhibiert, welches als das stammesgeschichtlich ursprünglichste Protein der sogenannten Perforin-Familie<sup>4</sup> gilt.

Antikörper vermitteln auch direkt als vielseitige Adaptoren -sozusagen als Verbindungsstücke- zwischen dem Mikroorganismus und dem Phagozyten, wenn ein Infektionserreger nicht erkannt werden kann. Da Immunoglobuline die Integrität und Individualität von Organismen ermöglichen, bedeutet der Ausfall der Antikörper-Synthese oder auch nur der Mangel von Antikörpern schwere pathogene Veränderungen. Beim Menschen erlangt ein Defizit der Antikörperproduktion schnell klinische Bedeutung, beispielsweise folgen schon einem Mangel allein an IgA Allergien oder auch maligne Tumoren (Peter, 1991; Zenone et al., 1996).

---

<sup>3</sup> Die terminalen Komponenten C5, C6, C7, C8 und C9 oligomerisieren zu einem transmembranalen Kanal - dem lytischen Membranangriffskomplex (MAC). Die Sequenzanalyse ergab eine große Übereinstimmung der Proteine C5, C6, C7, C8 und C9 mit Perforin, dem Killerprotein bestimmter Lymphozytenpopulationen.

<sup>4</sup> Dazu gehören (in der Reihenfolge ihres phylogenetischen Auftretens): Perforin, C9, C8, C7, C7 und C6. Perforin ist das kleinste und älteste Molekül (535 Aminosäuren). Das phylogenetisch jüngste und komplexeste Protein ist C6 (913 Aminosäuren) (DiScipio und Hugli, 1989; Tschopp und Nabholz, 1990).

Somit könnte vermutet werden, daß ein Abwehrsystem, das ohne Antikörper wirkt, dem Organismus nur geringe Überlebenschancen ermöglicht. Dem ist jedoch nicht so. Die Antikörper-unabhängige Immunität ist für alle Stämme der in der Evolution äußerst erfolgreichen Wirbellosen (Invertebraten) typisch. Die Leistungsfähigkeit dieses Antikörper-unabhängigen Systems wird beispielsweise dadurch demonstriert, daß in den Stämmen der Wirbellosen, die über eine allogene Immunerkennung verfügen, noch keine Tumoren beschrieben werden konnten (Roitt et al., 1995, *auch*: Kaiser, 1993; De Boeck und Kirsch-Volders, 1997). Weiterhin gestattet es den Invertebraten die Besiedlung aller Lebensräume, einschließlich der für Vertebraten und Säuger nicht zugänglichen Extremreservoir (Harvel, 1990a). Das Innere der wirbellosen Tiere ist ebenso "steril" (Urich, 1990) wie das der Wirbeltiere, obwohl die Gefahr der Kontamination keinesfalls geringer ist. Ein 'erfolgreiches Überleben' bezieht sich bei den sogenannten niederen Organismen jedoch nicht nur auf die größere Anzahl der besiedelten Lebensräume, sondern auch auf die phylogenetisch längere Dauer des Überlebens (Sima und Vetvicka, 1993).

Der sogenannte "another viewpoint" (Cooper et al., 1992) der Invertebraten-Immunologie auf die Probleme der Immunologie erfolgte bisher, von einigen gut untersuchten Insektengruppen abgesehen, an sehr einfachen Organismen, oft an den ersten Gewebetieren in der Evolution überhaupt (referiert bei Macek et al., 1994). Vom phylogenetischen Standpunkt aus sind Untersuchungen an den zweikeimblättrigen Organismen (Porifera (Schwämme), Cnidaria (Nesseltiere) und Ctenophora (Rippenquallen)) nicht problemlos, da erst mit dem evolutionären Auftauchen des dritten Keimblattes (Mesoderm) - beginnend bei den Plathelminthes (Plattwürmer) - das eigentliche Gewebe für die Bildung von immunologischen Faktoren zur Verfügung stand. Bei den untersuchten zweikeimblättrigen Organismen kann zum einen nicht immer zweifelsfrei geklärt werden, ob die untersuchten Faktoren überhaupt einen direkten Bezug zur Abwehr haben (Mangel et al., 1992; Smith und Davidson, 1994; Zhang et al., 1997); zum anderen haben die Faktoren einen völlig anderen phylogenetischen/ontogenetischen Ursprung, was eine Betrachtung unter den Gesichtspunkten der vergleichenden Immunologie erschwert<sup>5</sup> (Harvell, 1990b).

Trotz dieser stammesgeschichtlichen 'Vorgabe' werden seit Anfang der neunziger Jahre selbst lytische Systeme der Mikroorganismen als immunologische Faktoren dieser Organismen gesehen: Die Selbstschutz-Mechanismen, die einen Angriff der eigenen lytischen Proteinen

---

<sup>5</sup> Selbstverständlich ist ein Vergleich zwischen allen taxonomischen Gruppen möglich, aber gerade vom evolutionären Standpunkt aus erscheint eine vergleichende Studie ab den dreikeimblättrigen Organismen (Triploblasten) sinnvoller. Eine natürlich vorkommende humorale Immunität wird beispielsweise erst ab den Cölomata angenommen; Prozesse wie die Phagozytose, die zum Teil zu den Abwehrprozessen gerechnet werden, finden sich im gesamten Tierreich. Dort, wo in dieser Arbeit ein allgemeiner Vergleich porenformender Proteine aller taxonomischer Gruppen erfolgt, geschieht dies unter funktionellen Gesichtspunkten.

verhindern sollen, werden von mehreren Autoren als eine Form der Immunität der einzelligen Organismen aufgefaßt (Engelke et al., 1994; Kuipers et al., 1993; Reis et al. 1994; Venema et al., 1994; Abee 1995; Siegers und Entian, 1995; Siger et al., 1996). Die Annahme von Immunreaktionen in einzelligen Organismen ist jedoch sehr weitgehend.

Es kann nicht erwartet werden, daß sich einzelne immunologische Fähigkeiten in der Evolution kontinuierlich entwickeln. Die Phylogenie der Selbst/Fremd-Erkennung demonstriert dies eindrucksvoll: Porifera (Schwämme) und Cnidaria (Nesseltiere) gelten als die "primitivsten Stämme der Invertebraten" (Harvell, 1990b), jedoch verfügen sie als marine, oft koloniebildende Invertebraten über gut ausgebildete Mechanismen der allogenen und xenogenen Gewebeabstoßung. Diese Fähigkeiten sollen beispielsweise die Fusion einzelner Individuen untereinander verhindern. Bei den höherentwickelten Insekten und Mollusken, mit ihren bereits stark differenzierten Immunsystemen hingegen, sind diese Fähigkeiten schwach oder gar nicht ausgebildet (Lackie, 1986; Harvell, 1990), da die Wahrscheinlichkeit, daß es bei den solitären und mit einem Chitinpanzer umgebenden Insekten zu Gewebekontakten untereinander kommt, sehr gering ist. Dieser Teil der Selbst/Fremd-Erkennung brächte den Insekten daher keinen selektiven Vorteil und wurde im Laufe der Evolution aufgegeben.

Die immunologische Erkennung und Abstoßung wird bei Invertebraten über zytotoxische/zytolytische Reaktionen gewährleistet. Die Träger solcher Reaktionen sind vermutlich NK-Zellen<sup>6</sup>-ähnliche Strukturen, die membranzerstörende Proteine sezernieren. Ein deutlicher Unterschied zu den Vertebraten ist jedoch die Dauer, die diese Reaktionen in Invertebraten einnehmen. Diese sogenannten langsamen Immunreaktionen gelten für die Mehrzahl der Immunreaktionen in Invertebraten als typisch (Humphreys und Reinherz, 1994). Sequenzhomologien membranzerstörender Proteine sind innerhalb der Wirbeltierstämme gut untersucht. So sind die Membrantoxine im Gift der Klapperschlange (*Crotalus atrox*) homolog mit den membranaktiven Enzymen aus dem Rinderpankreas (Maraganore und Heinrikson, 1987). Solche Übereinstimmungen sind jedoch nicht nur auf Wirbeltiere beschränkt. Sogar Pflanzenproteine (Thionine<sup>7</sup>), die mit membranangreifenden Faktoren aus dem Immunsystem höherer Vertebraten homolog sind, wurden beschrieben (Oka, 1992).

Auch für das umfassendste Effektorsystem - das Komplement - wird über ein Vorhandensein in Invertebraten seit über drei Jahrzehnten intensiv spekuliert (Day et al. Immunsystem höherer

---

<sup>6</sup> NK-Zellen (natürliche Killer-Zellen) perforieren die Zielzelle mit porenbildenden Proteinen (Perforin) ohne vorherigen Antigenkontakt. Während dies bei Vertebraten nicht für die Mehrzahl der Immunreaktionen gilt, ist in Invertebraten die unmittelbare Erkennung ohne vorherigen Kontakt die Regel (Humphreys und Reinherz, 1994)

<sup>7</sup> Es wird vermutet, daß die Thionine eine Auseinanderstezung der Pflanze mit Bakterien ermöglichen (Huang et al., 1997).



Vertebraten homolog sind, wurden beschrieben<sup>8</sup> (Oka et al., 1970, Bertheussen, 1982, 1984; Enghild et al., 1990; Smith und Davidson, 1994). Mit dem Nachweis eines Proaktivators für die Komplementkomponente C3 bei Pfeilschwanzkrebsen (*Limulus polyphemus*) begann eine umfassende Suche nach Präformen des Komplementsystems bei Wirbellosen (Armstrong und Quigley, 1987). 1990 konnte wiederum bei *Limulus polyphemus* ein  $\alpha_2$ -Macroglobulin - ein Mitglied der Proteinfamilie, die auch die Komplementkomponenten enthält - nachgewiesen werden (Enghild et al., 1990). Dieses Protein ist aber für die lytische Aktivität des Serums nicht notwendig (Armstrong et al., 1993). Der Nachweis von einzelnen Komponenten, die sich zur Perforinfamilie (= terminale Komplementproteine und Perforin) homolog verhalten, steht noch aus (Cooper et al., 1992; Komiyama et al., 1997)<sup>9</sup>.

Komplement kann über zwei Wege aktiviert werden. Der sogenannte *klassische Weg* wird über Antikörper-Antigen-Komplexe ausgelöst. Der *alternative Weg* wird unter anderem durch Polysaccharide aus der Membran/der Zellwand von Mikroorganismen, Zellen mit niedrigem Neuraminsäuregehalt, Polyanionen und virusinfizierte Zellen direkt ausgelöst. Er ist somit unspezifisch (Bitter-Suermann und Hadding, 1991).

Nach ihrer Spezifität gegenüber dem Antigen werden die Abwehrmechanismen in einen spezifischen (synonym antizipatorischen oder adaptiven) und einen unspezifischen (synonym nicht-antizipatorischen oder angeborenen, auch: Resistenz) Mechanismus unterteilt. Beide Reaktionen wirken in Vertebraten nicht isoliert. Der spezifische von Antikörpern abhängige Mechanismus wird von unspezifischen begleitet. Letzterer galt allerdings gegenüber den spezifischen Prozessen als weniger bedeutend ("unintelligent, indiscreet and obsolescent" (referiert bei Fearon, 1997)). Neuere Ergebnisse zeigen hingegen, daß unsere Vorstellung vom zentralen Moment der spezifischen Immunreaktion - der Bildung der Antikörper und T-Zell-Rezeptoren, initiiert durch eine antigene Determinante - äußerst unzureichend ist, sowie, daß bestehende Hypothesen Defizite aufweisen (Fearon, 1997).

Fearon (1997) spekuliert, daß die spezifische Erkennung des Antigens und die nachfolgende

---

<sup>8</sup>Die Tatsache, daß nicht selten Domänen in ganz verschiedenen Proteinen mit übereinstimmender Sequenz gefunden wurden, hat zu der Vorstellung von der Neukombination von Genteilen durch Exonshuffling geführt. Die Theorie der Exonkombination ließ sich durch den Nachweis von acht homologen Exons (die zusammen 400 Aminosäuren codieren) im LDL-Rezeptor und im EGF-Vorläufer (epidermal growth factor), erstmals belegen. Außerdem sind mehrere der Sequenzen aus LDL-Rezeptor und EGF-Vorläufer mit der Komplementkomponente C9 homolog (Südhof, 1985).

<sup>9</sup> Breitere Akzeptanz fand die These von der möglichen evolutionären Verwandtschaft zwischen dem pro-Phenoloxidase-System und Komplement (Söderhall, 1982, Johansson und Söderhall, 1996). Beide Systeme haben einen kaskadenartigen Ablauf und einzelne Komponenten werden durch proteolytische Enzyme aktiviert.

Bildung der Antikörper vermutlich von dem unspezifischen Teil der Immunität abhängig sein könnte<sup>10</sup>, was deutlich über die Vorstellung der einfachen Wechselwirkung dieser beiden Immunantworten hinaus geht. Das Wissen über die nicht-antizipatorische Immunreaktion ist sehr begrenzt. Ihre Vernetzung mit der antizipatorischen Immunreaktion erschwerte eine separate Analyse. In Invertebraten scheint allein die nicht-antizipatorische, unspezifische Immunantwort vorzukommen, sie sind deshalb ein geeignetes Modell für die Untersuchung dieser Prozesse. Janeway (Tabelle 1) wies darauf hin, daß sich das zytolytische Effektorsystem der höheren Vertebraten in die Wirkungen der (i) unspezifischen, natürlichen Killer-Zellen und der (ii) spezifischen, zytolytischen T-Zellen teilt.

Die natürlichen Killer-Zellen können als die evolutionäre Vorstufe der zytolytischen T-Zellen aufgefaßt werden, wie auch der unspezifische, alternative Weg der Komplementkaskade der Vorläufer der spezifischen, klassischen Komplementaktivierung ist. Die unspezifischen Mechanismen erkennen ihre Zielzelle nicht an einem hochspezifischen bestimmten Epitop (= antigene Determinante), sondern sie wechselwirken mit einem breiten unspezifischen Spektrum an Substanzen (z.B. Polysaccharide der Bakterien- (LPS) oder Hefezellenmembran (Zymosan) oder in der mikrobiellen Zellwand verankerte Mannose).

Die immunologische Erkennung ist in den letzten Jahren zum Schlüssel der Analyse von Immunreaktionen geworden. So ist sie auch der entscheidende Punkt für die Unterteilung der Abwehr von Vertebraten (anticipatory immune responses) und Invertebraten (non-anticipatory immune responses)<sup>11</sup>. Während die Abwehr der Vertebraten die Selbst/Fremd-Erkennung über extrem individuelle Epitope realisiert, werden durch das Abwehrsystem der Invertebraten sogenannte 'heterophile Antigene' (wie bei der unspezifischen Abwehr der Vertebraten: z.B. LPS, Zymosan oder Mannose) erkannt. Für die nicht-spezifischen Effektormechanismen der Vertebraten konnten auch Nachweise in Invertebraten erbracht werden, so für das C-reaktive Protein (Robey und Liu, 1983; Armstrong et al., 1993) und die Phagozytose (Ottaviani

---

<sup>10</sup> Fearon (1997) bezieht sich auf Janeways (1989) Bemerkung vom "kleinen dreckigen Geheimnis des Immunologen". Diese bezieht sich auf die experimentelle Induktion einer adaptiven Immunantwort mit Freud'schem Adjuvant (Mineralöl, Emulgator und abgetötete Mykobakterien); im Experiment wird ein Protein erst durch das Einbringen in einen "Mineralöllösung" ein Antigen. Das "reine Antigen" muß "kontaminiert" werden, um eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Erst wenn Effektoren der nicht-spezifischen Immunität die Mykobakterien erkennen, könne das beigemischte Antigen eine adaptive Immunantwort hervorrufen.

<sup>11</sup> Auch wenn der Term "anticipatory/non-anticipatory" aus semantischen Gründen nicht durchgängig akzeptiert wird (Cooper et al., 1992), ist es erstaunlich, wie sehr die äußerst willkürliche taxonomische Einteilung von Wirbellos/Wirbeltier den zwei Formen der immunologischen Erkennung folgt. Die Wirbeltiere verfügen mit den Antikörpern über die Möglichkeit, alle theoretischen Epitope (z.B. künftig synthetisierte Antigene) spezifisch zu erkennen, die Faktoren der Wirbellosen wechselwirken hingegen mit der Gesamtheit einer chemischen Gruppe auf der Oberfläche von potentiellen Parasiten.

und Franceschi, 1997). Außerdem sind lytische Aktivitäten in Invertebraten beschrieben worden, die von einigen Autoren in ihrer Funktion als Komplement-ähnlich eingestuft werden (Tabelle 1) (Bertheussen, 1983; Canicatti und Ciulla, 1987, 1988).

**Tabelle 1.** Nicht-spezifische und spezifische immunologische Effektormechanismen (nach Janeway, 1989; Cooper et al., 1992)

| <b>Nicht-spezifische Effektormechanismen</b> | <b>Spezifische Effektormechanismen</b>                           |
|--|--|
| alternative Komplementkaskade                | Antikörper + klassische Komplementkaskade                        |
| Phagozytose                                  | Antikörper + Fc-Rezeptor induzierte Phagozytose                  |
| C-reaktives Protein                          | spezifische Antikörper gegen Phosphocholinanteile in der Membran |
| Makrophagenaktivierung                       | T-Zell abhängige Aktivierung der Makrophagen                     |
| natürliche Killer-Zellen                     | zytolytische T-Zellen  |

Nachdem indirekte Nachweise für eine NK-Zellen-ähnliche Aktivität im Bereich der Invertebraten bei Mollusken gelangen (Franceschi et al., 1991), wurde für bestimmte Zellen der Anneliden eine Ähnlichkeit mit NK-Zellen beschrieben (Quaglini et al., 1996). Eine immunologische Verwandtschaft der von NK-Zellen sezernierten Proteine - ermittelt über kreuzreagierendes Verhalten mit anti-Perforin-Antikörpern - konnte bei den zytolytischen Zellen der Anneliden bisher nicht nachgewiesen werden (Porchet-Henneré et al., 1992). Außerdem wurde mittels Elektronenmikroskopie bei Anneliden (Lumbriciden) nach den für NK-Zellen typischen, tunnelbildenden Proteinen - jedoch ohne Erfolg - gesucht (Roch et al., 1989).

Sowohl bei den lytischen Proteinen der Vertebraten der zellulären Immunität (z.B. NK-Zellen: Perforin), den lytischen Proteinen der humoralen Immunität (z.B. terminale Komplementkomponenten, Poly-C9), als auch den Hämolysinen der Invertebraten ist die physiologische Bedeutung nicht abschließend geklärt. Die Zuordnung dieser Proteine in den Bereich der immunologischen Abwehr ist, trotz der Attraktivität des Modells der immunrelevanten Lyse, nicht frei von einer gewissen Willkür. An dieser Situation haben die seit kurzem zur Verfügung stehenden "Perforin knock-out"- und "Perforin-Mangel"-Mäuse (Atkinson et al., 1995; Clark et al., 1995; Kägi et al., 1995) wenig geändert. Es gibt jedoch erste Indizien, die unter anderem für eine Beteiligung dieses lytischen Proteins an der Eliminierung von Tumorzellen und von nicht-zytopathischen Viren sprechen (Kägi et al., 1996).

## 2.2. Abwehrreaktionen bei Anneliden am Beispiel der Lumbriciden (Regenwürmer)

Lumbriciden, die nach der revidierten Taxonomie von Hrabě (1983) und Brinkhurst (1984) die Stammform der Oligochaeten<sup>12</sup> repräsentieren, von denen alle anderen Vertreter dieser Gruppe abzweigen, sind sehr interessante Organismen für vergleichende immunologische Untersuchungen. Sie verfügen bereits über Abwehrmechanismen, die sich entsprechend der klassischen Nomenklatur der Immunologie in humorale (lat. umor=Flüssigkeit, hier im Sinne von frei gelösten Substanzen, z.B. Hämolysine) und zelluläre Strategien (z.B. phagozytierende Zellen) einteilen lassen (siehe auch *Diskussion*, Kap. 5.1). Sie gehören zu den ersten Organismen in der Stammesentwicklung, die eine immunologische Erkennung und sogar ein immunologisches Gedächtnis<sup>13</sup> aufzeigen (Du Pasquier, 1992). Oligochaeten, speziell die Familie der Lumbriciden, standen wegen verschiedener immunologischer Fähigkeiten im Zentrum des Interesses. Hier ist vor allem die Fähigkeit zur Abstoßung von Geweben zu nennen (referiert bei Klein, 1997). Seitens der Ökologie wurde darauf aufmerksam gemacht, daß Lumbriciden wie *Eisenia fetida* ssp. (Mistwurm) auf Grund ihrer Abwehrfähigkeiten in speziellen Räumen (z.B. Kadaver) leben können. Insbesondere diese Lebensräume beherbergen vielfältige aggressive Mikroorganismen und werden deshalb nur durch ausgewählte mehrzellige Organismen besiedelt.

Zentraler Ort des Abwehrgeschehens der Anneliden ist das Cölom mesodermalen Ursprungs, das im Gegensatz zu allen anderen Geweben und Flüssigkeiten im Tier bis auf marginale Ausnahmen frei von Parasiten ist.

Die zelluläre Abwehr wird von verschiedenen Cölomozyten realisiert, die die Phagozytose und nachfolgend die Einkapselung von Pathogenen vermitteln (Sima und Vetvicka, 1993). Die Cölomozyten der Lumbriciden sind ein Teil des Abwehrsystems und an folgenden Reaktionen beteiligt:

- selbst/fremd-Erkennung
- Phagozytose

---

<sup>12</sup> Außerdem existiert seit 100 Jahren die von verschiedenen Autoren (referiert bei Kämpfe (1985)) diskutierte Ansicht, daß die Anneliden an die Basis der Entwicklung der Chordatiere zu stellen sind; diese "Wurm-Theorie" sieht in metamer gegliederten, wurmähnlichen Ausgangsformen die Ur-Deuterostomia, von denen sich die Vertebraten mit den später auftretenden Säugern direkt ableiten.

<sup>13</sup> Memory-effect (immunologische Gedächtnis) ist die in Folge eines Erstkontaktes erworbene Fähigkeit des Organismus, auf einen späteren Kontakt mit einem gleichen oder ähnlichen Antigen mit einem schnellen Anstieg des Antikörpertiters oder einer schnelleren Proliferation sensibilisierter Lymphozyten (memory cells) zu antworten. Das so erworbene immunologische Gedächtnis kann mittels der Lymphozyten auf einen syngeneten Organismus übertragen werden. Dieser Effekt wird für Invertebraten diskutiert, Nachweise gibt es u.a. für Anneliden und Nemertinen. Über den materiellen Träger des immunologischen Gedächtnisses bei Invertebraten wird bisher nur spekuliert (Bigger et al., 1981; Cooper et al., 1992).

- Einkapselung
- Abstoßung von Transplantaten (Cooper et al., 1992)

Im Gegensatz zu den Phagozytoseprozessen der Vertebraten sind bei den Anneliden keine Sauerstoffmetaboliten ( $O_2$ ,  $O_2^-$ , OH,  $OCI^-$  und  $H_2O_2$ ) bei der intrazellulären Abtötung der phagozytierten Mikroorganismen beteiligt (Bilej et al., 1991). Einige Befunde bei *Lumbricus terrestris* (Gemeiner Regenwurm) und *Eisenia fetida* lassen eine opsonierende Funktion<sup>14</sup> einzelner Cölomflüssigkeitskomponenten vermuten (Stein et al., 1977; Laulan et al., 1988; Bilej et al., 1990; Vetvicka et al., 1997).

Die durch den zellfreien Anteil der Cölomflüssigkeit von *E. fetida* ssp. induzierten Aktivitäten: hämolytische, agglutinierende, mitogene, bakteriostatische, zytotoxische, und eine tumorstatische, werden der humoralen Abwehr zugeordnet (Vallier et al., 1985; Kauschke und Mohrig, 1987; Mohrig und Kauschke, 1988; Lassegues et al., 1988, 1997; Hirigoyenberry et al., 1990; Roch et al., 1991; Hrzenjak et al., 1992, 1993).

Die hämolytische Aktivität ist von allen humoralen Wirkungen der Cölomflüssigkeit die stärkste; sie reicht sogar an die hämolytische Aktivität der effektivsten Killer-Zellen (*Entamoeba histolytica*) des gesamten Tierreiches überhaupt heran (Rosales-Encina, 1992; Leippe, 1997). Mehrere Arbeitsgruppen haben sich, nach dem Nachweis der hämolytischen Aktivität in der Cölomflüssigkeit im Jahre 1968 durch Du Pasquier und Duprat, um eine nähere Charakterisierung der Aktivität bemüht (Valembois et al., 1982; Tuckova et al., 1986; Roch et al., 1989; Hrzenjak et al., 1991; Eue et al., 1991; Bilej et al., 1995).

Die in Folge dieser Untersuchungen festgestellten Differenzen der hämolytischen Aktivität (Aktivitätstiter vor und nach Immunisierung, Inhibierung durch verschiedene Zucker oder die Temperaturabhängigkeit) der Cölomflüssigkeit in *Eisenia fetida* ssp. durch verschiedene Arbeitsgruppen gaben Hinweise auf die Charakterisierung unterschiedliche Moleküle (alle im Molekulargewichtsbereich um 40 kDa), beziehungsweise auf mögliche eigenständige (Unter-)Arten. Wir konnten beispielsweise die hämolytische Wirkung der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida* ssp. in einer Verdünnung von 1:100.000 gleichermaßen vor und nach einer Immunisierung nachweisen, die Arbeitsgruppe um Roch (1981) gab für Erythrozyten der gleichen Spezies einen Titer von 1:4000 vor einer Immunisierung und danach von 1:32000 an. Die elektrophoretisch aufgetrennte Cölomflüssigkeit zeigt nach Überschichtung des Trenngels mit einer Erythrozyten-Agar-Suspension deutliche Lysehöfe. Roch beschrieb zwei lytische Proteine bei 40 kDa und 45 kDa (Roch et al., 1989), unsere Arbeitsgruppe identifizierte mit dieser Methode drei Hämolysanden mit einem Molekulargewicht von 38-40 kDa, 42 kDa und 45 kDa (Eue et al., 1991; Mohrig et al., 1996). Es ist immer wieder diskutiert worden, ob *Eisenia fetida* eine homogene

---

<sup>14</sup> Zur Jahrhundertwende eingeführter Begriff für Serumfaktoren, die eine Bindung von Bakterien und partikulären Antigenen am Phagozyten vermitteln. Mohrig et al. (1984) haben dem Vorhandensein von opsonierenden Faktoren in Lumbriciden widersprochen, hingegen gilt die stimulierende Wirkung von Opsoninen aus Vertebraten (z.B. Komplement C3-Fragmente) auf die Aktivität der Phagozyten aus Regenwürmern als gesichert (Laulan et al., 1988).

taxonomische Gruppe darstellt. Überwiegend wird in der Literatur<sup>15</sup> von einer einzigen Art ausgegangen, auch wenn seit Anfang der sechziger Jahre Subspecies (*Eisenia fetida fetida* und *Eisenia fetida andrei*) vorgeschlagen wurden (Andre, 1963; Bouche, 1972). Jaenike (1982) formulierte die weitergehende These: "'*Eisenia foetida*' is two species." (auch: Oien und Stenersen (1984)). Die unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeitsgruppen zum Proteinmuster der vollständigen und fraktionierten Cölomflüssigkeit, der unterschiedlichen biochemischen Merkmale der Cölomflüssigkeit (Roch et al., 1981; Kauschke und Mohrig, 1987; Roch et al., 1989; Eue et al., 1991; Mohrig et al., 1996), sowie die Resultate von Oien und Stenersen (1984), die Hybridsterilität der sogenannten Unterarten betreffend, stützen die These der zwei Arten.

Die unterschiedlichen isolierten hämolytisch aktiven Proteinen können - isoliert betrachtet - keinen Hinweis auf mehrere Arten geben, da nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß sie beide in *E. fetida* ssp. vorkommen (ausführlich in *Diskussion*).

Die Analyse der Wechselwirkung der lytischen Aktivität mit der Zielzelle erwies sich als schwierig, da nur semi-gereinigtes Material zur Verfügung stand (Roch et al., 1986; Hrzenjak et al., 1991; Bilej et al., 1995). Die Isolierung der lytischen Proteine war auf Grund von unspezifischen Reaktionen der interessierenden Proteine mit den Trägersubstanzen der Trennmaterien kompliziert (Mohrig et al., 1996). Sogenannte semi-gereinigte und bis zur Homogenität gereinigte Hämolysine können deutlich unterschiedliches Verhalten zeigen (Clinkenbeard et al. (1989, 1991) vs. Cruz et al. (1990)). Ab Mitte der neunziger Jahre bemühte man sich - aufgrund des größer werdenden Interesses an lytischen Peptiden/Proteinen - äußerst intensiv um die Isolierung der hochwirksamen hämolytischen Proteine der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida* ssp. (Bilej et al., 1995; Lange et al., 1995; Mohrig et al., 1996; Sekizawa et al., 1996; Milochau et al., 1997; Lange et al., 1997).

Die biologische Funktion der hämolytischen Aktivität wird in der Abwehr mikrobieller Pathogene gesehen (Vaillier et al., 1985), insbesondere da die Wirbeltiererythrozyten und die untersuchten, hoch pathogenen Mikroorganismen ein gemeinsames Antigen besitzen (Roch et al., 1987). Dies ist jedoch nicht unbedingt ein überzeugender Beweis, da gerade eine Antigen-Gemeinsamkeit von nicht-pathogenen Mikroorganismen mit den lysierten Erythrozyten erwartet hätte werden können.

Es konnte jedoch bisher nicht abgeklärt werden, welches Protein für die hämolytische Aktivität verantwortlich ist. Immer wieder ist angezweifelt worden, daß ein einzelnes Protein aus der Cölomflüssigkeit die Lyse der Targetzelle induziert. Die elektrophoretische Auftrennung der Cölomflüssigkeit mit anschließender Übersichtung mit Blut-Agar erfolgte in Nativgelen, die keine Separation nach dem Molekulargewicht gestatten, so daß das Vorhandensein separierter Lysebande nicht als Hinweis für die Wirkung eines einzelnen Proteins akzeptiert wurde. Vor allem für die lytischen Moleküle mit einem sehr geringen molekularem Gewicht - wie dem

---

<sup>15</sup>Dies bezieht sich auf die physiologische und immunologische (d.h. nicht-taxonomische) Literatur.

Flavin-ähnlichen 2,6 kDa Peptid - wurde eine entscheidende kooperative Rolle für den Lysevorgang im Zusammenhang mit den sogenannten "großen" Hämolysinen (40-45 kDa) angenommen (Sinkora et al., 1993 und 1995; Bilej, persönliche Mitteilung).

Die hämolytische Aktivität, die zum Teil mit einer agglutinierenden verknüpft ist, zeigt sich durch Kohlenhydratstrukturen und Glykoproteine inhibierbar und genügt daher den Kriterien der Lektine oder Lektin-ähnlicher Substanzen (Roch, 1979; Roch et al, 1986; Lassalle et al., 1993; Ville et al; 1995; Mohrig et al., 1997; Eue et al., 1997). Vor allem wegen ihres spezifischen Bindungsvermögens werden Lektine als den Antikörpern analoge Strukturen diskutiert (Ziska und Franz, 1981; Boman, 1991; Cooper et al., 1992; Du Pasquier 1992; Kauschke et al., 1997). In vivo sind Lektine in der Lage, den Kontakt von Killer-Zelle und Ziel-Zelle zu vermitteln, der im lebenden Organismus durch Antikörper ermöglicht wird. Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, daß die Zellen, die die lytischen Proteine bei *Eisenia fetida* ssp. produzieren, den NK-Zellen in Form und Funktion adäquat sind. Der Nachweis porenbildender Proteine gelang jedoch nicht (Quaglini et al., 1996).

Eine Analogie wie auch eine Homologie der lytischen Aktivität bei Anneliden zu zytolytischen Strukturen der Vertebraten - wie Perforin und Komplement - wurde bisher ausgeschlossen. Die ultrastrukturelle Analyse der Läsionen der Targetmembran zeigte nicht die für das Komplement typische ringförmige Proteinporenstruktur (Roch et al., 1989). Außerdem beeinflussen Inhibitoren/Regulatoren der lytischen Komplementproteine (Protamin und Heparin) die lytische Aktivität von Cölomflüssigkeits-Fractionen nicht (Roch et al., 1989, Canicatti, 1990). Auch Substanzen (Zymosan und Inulin), die eine regulierende Funktion speziell auf die zentrale Komplementkomponente C3 besitzen, beeinflussen die lytische Aktivität in Anneliden nicht (Quigley et al., 1984; Söderhall 1984).

Die sehr starke lytische Aktivität bei *Eisenia fetida fetida* warf die Frage des Schutzes vor einer Autolyse auf. Körpereigene Regulatoren, die den Selbstschutz körpereigener Zellen realisieren, konnten bei den Anneliden - wie bei allen untersuchten Invertebraten - nicht nachgewiesen werden. Von einigen Autoren wurde eine regulierende Wirkung der lytischen Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen angenommen (referiert bei Canicatti, 1990). Da Anneliden bereits über ein umfassendes Immunsystem verfügen, kann vermutet werden, daß sich die Einteilung der Immuneffektoren in humoral und zellulär auch bei möglichen Regulatoren als löslich und membranständig wiederfindet (Canicatti, 1990). Wobei ein membranständiger Schutz vermutlich nicht über einen membranverankerten Regulator ermöglicht wird, da dies bei lytischen Faktoren, die ohne vorherige Antigenexposition sofort mit dem Target reagieren, nicht erwartet werden kann<sup>16</sup>. In dem Antikörper-unabhängigen System der Anneliden muß das lytische Vermögen zwischen selbst und fremd unterscheiden, um ein humoraler Garant der Integrität und Individua-

---

<sup>16</sup> Genauere Untersuchungen liegen für dieses Phänomen bei der Reaktion NK-Zelle/Target vor (Liu et al., 1995), eine Beeinflussung durch Proteine der Membranoberfläche ist nur bei Antikörper-abhängigen Killerzellen möglich.



lität des Organismus zu sein. Diese Erkennung von selbst und fremd erfolgt bei den lytischen Proteinen der Invertebraten (im Gegensatz zu der immunologischen Selbstdiskriminierung bei Vertebraten) vermutlich weniger über die Anwesenheit von Strukturen, die dem Immunsystem ein 'Selbst' signalisieren, sondern durch die Abwesenheit von Rezeptoren (Meinardi et al., 1995). Die verfügbaren Daten gestatteten bisher jedoch keine Analyse der Wechselwirkung zwischen lytischen Proteinen und Rezeptor beziehungsweise Target.

### **2.3. Membran-Wechselwirkungen lytischer Proteine**

Da lytische Proteine neben den Anneliden auch in anderen Organismen beschrieben wurden, liegen sehr viele Einzelinformationen vor. Die Versuche, diese Vielzahl an Informationen zu systematisieren, führte nach gegenwärtigem Erkenntnisstand zu folgenden Einteilungen:

- 1.) nach der Struktur der Läsion (diskrete und nicht-diskrete Membranschädigung) (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1983, Bhakdi et al, 1996) und
- 2.) nach dem Mechanismus der Strukturbildung (z.B. detergensähnliche oder enzymatische Wirkung) (Rowe und Welsch, 1994)<sup>17</sup>.

Der Einteilung der Toxine nach ihrer Reaktion an der Membran folgend (Punkt 1.) wären die umfangreich untersuchten RTX-Toxine der gram-negativen Bakterien (Coote, 1992), das *Escherichia coli* Hämolysin (Moayeri und Welch, 1997) oder das humane Perforin (Cerottini und Tschopp, 1997) Proteine, die durch eine diskrete, porenförmige Membranläsion wirken. Zu der Gruppe der Toxine, die nicht-diskrete Schädigungen der Membran initiieren, gehören Mellitin (Cajal und Jain, 1997), das  $\alpha$ -Toxin von *Clostridium perfringens* (Schoepe et al., 1997; Bunting et al., 1997) und alle Phospholipasen, beispielsweise im Schlangengift (Maraganore und Henrikson, 1986).

Die morphologische Charakterisierung der Schädigung der Membran kann jedoch nicht immer eindeutig erfolgen. In ihrer Einteilung der Zytolysine orientieren sich Rowe und Welsch (1994) deshalb an dem lytischen Mechanismus des wirkenden Substrats (nach Punkt 2.), sie unterscheiden zwischen:

- einem enzymatischen Mechanismus, z.B. durch das  $\beta$ -Toxins von *Staphylococcus aureus* (Cifrian et al., 1996; O'Callagha et al., 1997),

---

<sup>17</sup> Diese beiden Einteilungen schließen sich nicht aus; die erste charakterisiert die Targetmembran hinsichtlich einer eng umgrenzten (diskreten) oder nicht umgrenzten (nicht-diskreten) Schädigung, die zweite Einteilung wird nach der Verwirklichung dieser Struktur durch das Toxin vorgenommen. Es ist jedoch zu diskutieren, inwieweit bei einer Membranschädigung, die durch eine Wechselwirkung von Toxin und Membran induziert wird, eine Einteilung nach Toxinwirkung zum einen und dem Resultat an der Membran zum anderen zwingend ist. Wir folgen dieser Einteilung, da sie international akzeptiert ist und eine Klassifikation der Toxine in der Literatur nach dieser Einteilung vorgenommen wird.

- der Poren-Formation durch Proteinmonomere beispielsweise bei Streptolysin O (Boulnois et al., 1992; Sekiya et al., 1996) und
- der Aktivität Detergens-ähnlicher Zytolysine, wie sie für das hitzestabile Hämolyisin von *Pseudomonas aeruginosa* (Johnson und Boese-Marrazzo, 1980; Burke et al., 1991) beschrieben ist.

Bakterientoxine, die als virulenter Faktor ein porenbildendes Protein besitzen, werden intensiv seit Beginn dieser Dekade analysiert: *Vibrio parahaemolyticus* (Honda et al., 1992) ist für 70% aller Nahrungsmittelvergiftungen in Japan verantwortlich (Raimondi et al., 1995), *Streptococcus suis* verursacht Arthritis, Meningitis oder Pneumonien (Jacobs et al., 1994; Higgins und Gottschalk, 1997) und *Gardnerella vaginalis* ist eng mit bakterieller Vaginitis verbunden (Moran et al., 1992; Pybus und Onderdonk, 1997). Diesen Proteinen ist wie anderen prominenten Porenformern (Colicin A (Jeanteur et al., 1994;),  $\alpha$ -Toxin (Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991a), Aerolysin (Rossjohn et al., 1997) und Streptolysin-O (Boulnois et al., 1992)) gemeinsam, daß sie von einzelligen Organismen stammen. Über die lytischen Proteine der mehrzelligen Organismen liegen, sieht man von den Säugern ab, sehr wenig Daten vor (Mangel, 1992; Macek et al., 1994; Narat et al., 1994). Für vergleichende Untersuchungen erweist sich dies als Hindernis. Vor allem wenn sie phylogenetische Einblicke gestatten sollen, gilt ein Vergleich von mindestens drei verschiedenen Taxa als notwendig (Rieppel, 1987; Wake, 1990; Copper et al., 1992).

Gibt es neben der Funktionsähnlichkeit der Porenformer auch ein gemeinsames strukturelles Motiv? Die Frage resultierte aus der bis heute offenen Auseinandersetzung von Bhakdi und Trantum-Jensen (1991b) vs. Esser (1991) nach der Struktur der Läsion: als Proteinpore ("protein-walled channel", Bhakdi und Trantum-Jensen (1991b)) oder als Lipidpore ("leaky patch formation", Esser (1991)).

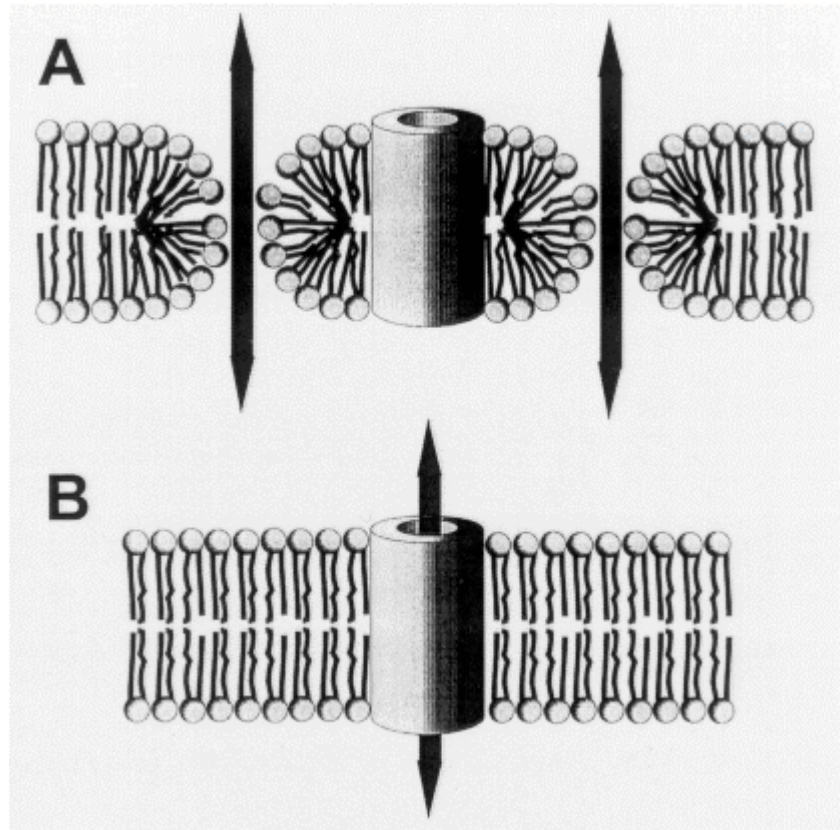


Abb. 1. Die Porenkonzepte vom (A) Esser (1991) und (B) Bhakdi und Tranum-Jensen (1991b). Beide Modelle wurden in der Debatte über den Mechanismus der Komplement-induzierten Lyse vorgeschlagen. Modell A demonstriert die 'leaky patch hypothesis'; der Einbau des Porenkomplexes in die Membran induziert eine Neuordnung der Lipide, so daß die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide einen Lipidkanal bilden. Modell B zeigt das Konzept des "protein-walled channel" ("Complement lysis: a hole is a hole", Bhakdi und Tranum-Jensen, 1991). Im Modell B bleibt der Komplex fest mit der Membran verbunden. Der Defekt in der Membran ist deshalb stabil und besitzt eine feste, definierte Größe. Die Pfeile zeigen mögliche Passagen der hydrophilen Moleküle im jeweiligen Konzept an (modifiziert nach Bhakdi und Tranum-Jensen, 1991b).

Ojcius und Ding-E Young (1991) haben eine Systematisierung der porenbildenden Proteine in große und kleine Porenformer vorgeschlagen. Für die kleinen porenbildenden Proteine/Peptide, zu denen Mangainin, Cecropine und das Staphylococcus  $\delta$ -Toxin gehören, wurde als gemeinsames Motiv eine "rigide" (Ojcius

und Ding-E Young, 1991), dreidimensionale Struktur aus amphiphilen  $\alpha$ -Helices bzw.  $\beta$ -Faltblättern gefunden. Für die großen porenbildenden Proteine, mit den Vertretern Perforin oder Aerolysin, konnte kein gemeinsames Motiv nachgewiesen werden. Ohne sich auf diese Überlegungen zu beziehen, postulierte Tytler et al. (1993) als mögliches gemeinsames Motiv bei porenbildenden Proteinen, die nach der Einteilung von Ojcius und Young mehrheitlich den kleinen Porenformern zuzuordnen wären, einen Kegel als die Membran destabilisierende Struktur, der sich invers - mit dem Stumpf zuerst - in die Membran integriert. Das Modell des "umgekehrten Kegels" ist für die Störung der Bilayerstruktur der Membran durch spezifische

Phospholipide (z.B. Phosphatidylserin in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ , Datta, 1987) gut dokumentiert.

Da sich Untersuchungen zu Porenformern größtenteils auf Säuger und auf für Säuger pathogene Einzeller fokussieren, soll mit der vorliegenden Arbeit versucht werden, ein porenbildendes Protein bei Invertebraten zu isolieren und zu charakterisieren. Des weiteren soll eine vergleichende, funktionale Untersuchung ermöglicht werden, die Daten dreier Taxa (Protozoa (beziehungsweise anderer einzelliger Organismen), Annelida und Mammalia) einschließt. Diese Anzahl von Vertretern verschiedener Stämme gilt als unterste Grenze für die Anzahl der benötigten taxonomischen Gruppen für eine vergleichende Untersuchung, unabhängig davon, ob Analogien oder Homologien erarbeitet werden sollen. Durch das Fehlen von eingehenden Untersuchungen porenbildender Proteine mehrerer Taxa sind vergleichende Untersuchungen bisher nur in sehr begrenztem Maße möglich (siehe auch: funktioneller Vergleich von Porenformern zweier Taxa: Bakterien und Holothurien<sup>18</sup> (Hatakeyama et al., 1996)).

Außerdem kann eine Analyse von lytischen Faktoren der Anneliden unser Wissen um die bisher kaum untersuchten sogenannten schnellen Immunreaktionen bei Invertebraten bereichern. Ein Großteil der eingehend untersuchten Immunreaktionen bei Invertebraten nimmt einen Zeitraum von Tagen oder Wochen ein<sup>19</sup> (siehe auch: Humphreys und Reinherz, 1994 und Kapitel 2.2.). Eine Aufteilung von schnellen Reaktionen im Sekundenmaßstab lag vor Beginn dieser Arbeit für dreikeimblättrige Invertebraten nicht vor.

Das Studium der immunologischen Leistungen der Wirbellosen offenbart nicht nur einzigartige - das meint, in Vertebraten nicht vorkommende - immunologische Mechanismen wie dem Phenoloxidase-System, das über die "gerbende Wirkung" (Götz, 1988) der Phenoloxidase Pilze oder Bakterien härtet und einkapselt. Es gibt uns auch die Möglichkeit, die vielfältigen Informationen über Immunreaktionen durch die Beschreibung von analogen Prozessen zu klassifizieren. Es ist sogar möglich, Einblicke in die Evolution hochentwickelter Immunsysteme der Vertebraten zu erhalten.

Aus den dargelegten offenen Fragen ergeben sich Ziele und Aufgaben der Arbeit. Es gelang vor Beginn dieser Arbeit trotz zahlreicher Versuche nicht, ein Hämolysin der Anneliden (Erstbeschreibung durch Du Pasquier und Duprat, 1968) zu isolieren. Anhand des isolierten Proteins soll untersucht werden, ob ein Protein ausreicht, um die Lyse der Zielzelle zu induzieren. Wenn es einen kooperativen Prozeß gibt (erstmalig vermutet von Roch et al., 1984), ist zu klären, ob dieser von unterschiedlichen oder gleichartigen Proteinen induziert wird. Da für die Hämolysine der Anneliden eine  $\alpha$ -helicale Struktur postuliert wurde (Milochau et al., 1997, wäre die Sekun-

---

<sup>18</sup> Die Vertreter der Holothurioidea (Seewalzen) sind Vertreter der Deuterostomier.

<sup>19</sup> So wird allogenenes Material bei Echinodermaten nach 300 Tagen zerstört, bei Anneliden werden für xenogene Gewebe noch 50 Tage für eine Abstoßungsreaktion benötigt. Beim Menschen wird allogenenes Material beginnend nach 48 Stunden abgestoßen, Erfahrungen mit xenogenem Material (z.B. Affenherzen) liegen zu wenig vor, um eine gesicherte Größe zu bestimmen.

därstruktur des Proteins zu überprüfen. Für eine Klassifikation des Hämolysins muß die Struktur der Membranschädigung untersucht werden. Bisher wurde eine Analogie des Hämolysins zu C9 verneint (Roch et al., 1989; Canicatti 1990). Im Zusammenhang mit der Analyse der Membranschädigung, wäre ein Nachweis einer immunologischen Verwandtschaft ein deutlicher Hinweis für eine Analogie dieser Strukturen. Die Identifizierung der molekularen Struktur des Targets ist ein zentrales Problem, um Aussagen über die biologische Wirkung des Hämolysins treffen zu können. Liposomen sind ein geeignetes Modell um die lytische Aktivität näher zu charakterisieren. Für die Aktivität einiger Invertebraten-Hämolysine (Macek et al., 1994; Meinardi et al., 1995) wurde die Bedeutung von Sphingomyelin beschrieben, es wird vermutet, daß Sphingomyelin ein wichtiger Rezeptor für die Membranwechselwirkung dieser Proteine ist.

Ein bisher ungelöstes Problem ist der Schutz der Invertebraten vor ihren eigenen Hämolysinen. Daraus ergibt sich die Zielstellung, eine mögliche regulierende Struktur zu identifizieren und diese vergleichend zu charakterisieren.

Bisher sind die mit *Eisenia fetida* (ssp.) gewonnenen Resultate über die hämolytischen aktiven Komponenten oft widersprüchlich. Ein Abgleich der neu gewonnenen mit den bereits vorhandenen Daten sollte es daher ermöglichen, die Unterschiede der Moleküle näher zu charakterisieren und insgesamt aufzuklären, ob *Eisenia fetida* eine homogene Gruppe darstellt.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Hälterung der Anneliden und Gewinnung der Cölomflüssigkeit

In den Experimenten kamen Tiere der folgenden Lumbricidenspecies zum Einsatz: *Eisenia fetida fetida* (Bouche), *Lumbricus terrestris* (L.), *Allobophora caliginosa* (Sav.). Sie wurden an 16 verschiedenen Regionen in Norddeutschland kurz vor Versuchsbeginn gesammelt, um eine längere Hälterung in Kulturgefäßen zu vermeiden. Die Hälterung erfolgte bei 15 °C - 20 °C in Material des natürlichen Milieus. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mit Leitungswasser gereinigt und für 48 h mit feuchtem Filterpapier abgedeckt und bei 6 °C gelagert. Die Cölomflüssigkeit wurde durch Punktierung in den Cölomraum mit einer Glaskapillare gewonnen, die kaudal vom Klitellum in das Cölom eingeführt wurde. Die von 40 Tieren gepoolte Cölomflüssigkeit wurde zentrifugiert (13.000 x g, 17 min) und der Überstand wurde sofort für die Reinigung verwandt.

#### 3.2. Gewinnung und Verwendung der Erythrozyten

Die Gerinnung des gewonnenen Vollblutes der jeweiligen Spezies (Hammel, Kaninchen, Ratte, Katze, Mensch) wurde durch den Zusatz von Heparin<sup>20</sup> (CP Pharmaceutical Limited, Wrexham) verhindert. Die Erythrozyten wurden durch eine Zentrifugation (1500 x g, 20 min) bei 4 °C sedimentiert und anschließend dreimal in 0,9 % (m/v) NaCl gewaschen.

*Fixierung der Erythrozyten:* Zum Nachweis einer agglutinierenden Aktivität von Proteinen wurden formalinisierte Erythrozyten verwandt: zu 100 ml einer 20% (v/v) Erythrozytensuspension wurden über 60 min tropfenweise 8,14 ml einer 37% (v/v) Formaldehydlösung gegeben. Nach Inkubation von 16 h bei 4°C wurde diese Lösung viermal mit 0,9 % (m/v) NaCl gewaschen und im Test verwandt.

#### 3.3. Präparative Elutions-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eiseniapore und der Eiseniapore-regulierende Faktor wurde mittels präparativer Elutions-Polyacrylamidgelelektrophorese isoliert.

*Eiseniapore:* Ein modifiziertes Ornstein-Davis Puffersystem (Tris/Chlorid/Glycin) (Ornstein, 1964, Davis, 1964) wurde für die Isolierung Eiseniapores verwandt: oberer und unterer Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 192 Glycin), Elutionspuffer (25 mM Tris, 192 Glycin, 2 mM reduziertes Glutathion, 1,5 mM Thioglykolsäure) und Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v)

---

<sup>20</sup>Außer bei den Versuchen zur Bestimmung des Komplementtiters

Glycerol, 0,025% (m/v) Bromphenolblau, 2 mM reduziertes Glutathion, 2 mM Thioglykolsäure und 4 mM Phenylmethylsulfonylfluorid). Durch die Zugabe von reduziertem Glutathion und Thioglykolsäure konnte die biologische Aktivität des Proteins geschützt werden. Die Monomerkonzentration für eine maximale Auflösung der Proteine wurde empirisch mit analytischen Gelen (siehe: Analytische PAGE) gewonnen. Das genutzte System, welches für die präparative Elektrophorese genutzt wurde, bestand aus einem Trenngel (38 ml Volumen Monomer von 7% (m/v) Acrylamid, 0,18% (m/v) Bisacrylamid) und einem Sammelgel (5 ml Monomer von 4% (m/v) Acrylamid, 0,106% (m/v) Bisacrylamid). Die präparative Elektrophorese (Model 491 Prep Cell, Bio-Rad, California, USA) lief für 13,5 h bei 15 W mit einer Flußrate von 1 ml/min bei einer Temperatur von 4 °C. Die Fraktionen wurden bei 4°C gesammelt und mit einer Suspension von 2% Schaferythrozytensuspension auf ihre lytische Aktivität im Mikrotiterassay getestet. Die hämolytischen Fraktionen wurden mit einer 5-10% (v/v) SDS-PAGE untersucht und die bis zur Homogenität gereinigten Proben dialysiert und lyophilisiert.

*Regulatorproteine aus der Cölomflüssigkeit Anneliden:* Für die Isolierung des Eiseniapore-regulierenden Faktors wurde die gleiche Prozedur wie für die Reinigung Eiseniapores verwandt. Das genutzte Gelsystem wurde wie folgt zusammengestellt: Trenngel (15 ml Monomer von 4% (m/v) Acrylamid und 0,106% (m/v) Bisacrylamid) und Sammelgel (5 ml Monomer 4% (m/v) Acrylamid und 0,106% (m/v) Bisacrylamid). Die Elutions-Elektrophorese wurde bei 15 W für 15 h bei einer Temperatur bei 4 °C durchgeführt, die Flußrate des Elutionspuffers betrug 1 ml/min. Die Fraktionen, die eine inhibierende Wirkung auf die lytische Aktivität von Eiseniapore besaßen, wurden mit einer 5-10% (v/v) SDS-PAGE untersucht. Die bis zur Homogenität gereinigten Proben wurden dialysiert und lyophilisiert.

### 3.4. Isolierung des Vitronectins (synonym: S-Protein)

Die Isolierung Vitronectins erfolgte mit einer Heparin-Sepharose Säule nach der Methode von Kitagaki-Ogawa (1990), modifiziert nach Nakashima et al. (1992): 1 ml Meerschweinchen-serum (0,9 mg/ml) oder 1 ml Cölomflüssigkeit der entsprechenden Anneliden (4,2-6,9 mg/ml) passierten eine Säule (25 ml) mit dem Trägermaterial Heparin-Sepharose. Das Serum und die Cölomflüssigkeit passierten die Säule. Vitronectin oder der Anneliden-Regulator banden spezifisch an Heparin-Sepharose und konnten mit 0,5 M NaCl in Gegenwart von 8 M Harnstoff eluiert werden.

*Dekomplementiertes Serum:* Für einige Versuche wurde statt Vitronectin Serum oder dekomplementiertes Serum verwandt. Das Serum wurde nach der Methode von Nielsen et al. (1984) dekomplementiert. Hydrazin (0,2 M) wurde für 6 Stunden mit Serum inkubiert (37 °C), anschließend über Nacht bei 4 °C dialysiert.

### 3.5. Analytische Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE (nicht-reduzierende Bedingungen) wurde in einem 5-10% (m/v) Acrylamidgel in einer vertikalen Apparatur (Protean 2 xi Vertikal Electrophoresis Cells, Bio-Rad, California, USA) durchgeführt. Die Proben wurden durch das Mixen gleicher Volumina Probe und Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) Glycerol, 2% (m/v) SDS, 5 % (m/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol), gefolgt von einem 5 minütigen Kochen, präpariert. Die Elektrophorese wurde bei 250 V und Raumtemperatur durchgeführt, die Dauer variierte je nach Probe von 2 bis 3 Stunden. Die Proteinbanden auf den Gelen wurden mit einer Färbung durch Silbernitrat nach der Methode von Heukeshoven et al. (1986) sichtbar gemacht.

### 3.6. Monospezifische Antiseren

*Gegen Eiseniapore:* Kaninchen wurden immunisiert, indem subdermal in den Tierrücken 20  $\mu$ g des gereinigten Eiseniapore in Freund'schem Adjuvant appliziert wurden. Eine zusätzliche Immunisierung wurde nach zwei Wochen wiederholt. Die Antikörper aus dem Serum wurden über eine Protein A-Sepharosesäule (Bio-Rad, California, USA) mit einer finalen Konzentration von 0,5 mg/ml gereinigt. Die Neutralisation von 80  $\mu$ l Eiseniapore (5  $\mu$ g/ml) erfolgte mit 40  $\mu$ l Antikörper (100  $\mu$ g Antikörper/ml) bei 25 °C für 20 min.

*Gegen C9:* Das polyklonale, gegen humanes, reduziertes C9 gerichtete Antiserum (aus dem Schaf) stammt von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

*Gegen Vitronectin:* Das polyklonale, gegen humanes Vitronectin gerichtete Antiserum (aus Kaninchen) stammt ebenfalls Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

### 3.7. Liposomenpräparation

Lipide (alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland) der gewünschten Komposition (Gesamtkonzentration 750  $\mu$ mol/l) wurden in 1 ml eines Gemisches von Chloroform/Methanol (1:1; v/v) gelöst und mit Stickstoff abgedampft. Die Lipide wurden in Tes-Puffer (100 mM NaCl, 2 mM Tes, 2 mM L-Histidin und 1 mM EDTA, pH 7,4) hydratisiert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUV) verwandt. Die SUV wurden durch Ultraschallung der Lipidsuspension auf Eis mit einem Branson-Sonifier (Danbury, USA) für 8 min präpariert. Große unilamellare Vesikel (large unilamellar vesicles, LUV) verschiedener Komposition wurden nach sechs 'Gefrier-Tau-Zyklen' mit einem Extruder (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Kanada) gewonnen, indem sie durch zwei übereinander liegende Polycarbonat-Membranen (Nucleopore, USA) mit 0,1  $\mu$ m Porengröße gepreßt wurden. ANTS (8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure)/DPX (p-Xylen-bis-pyridiumbromid) (Molecu-



lar Probes, USA) - gefüllte Vesikel und Erythrozytenghost (siehe unten) wurden verwandt, um den Eiseniapore-induzierten Leakage von Vesikeln und 'ghost' zu messen. Der Einschluß des wasserlöslichen ANTS/DPX-Komplexes in die Vesikel und der Leakage-Assay erfolgte nach der Methode von Ellens et al. (1985). Die Vesikel enthielten 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX, 20 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Die Vesikel wurden von dem nicht eingeschlossenem Material mittels Chromatographie über eine G-75 Säule mit Tes-Puffer abgetrennt. Der gleiche Puffer, aber mit 0,1 mM EDTA wurde für den Leakage-Assay genutzt.

### *3.8. Präparation von geschlossenen (resealed) Ghosts und Nanoerythrosomen*

Geschlossene Ghosts und Nanoerythrosomen wurden nach einer Methode vom Schwach und Passow (1978), modifiziert nach Pomorski et al. (1994), hergestellt: 2 ml einer eiskalten Suspension gewaschener Erythrozyten (90% gepackt) wurde in 1,2 mM Essigsäure, 4 mM  $\text{MgSO}_4$  und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 3) lysiert. Nach 5 min wurden die Erythrozyten zentrifugiert, in Puffer (12,5 mM ANTS, 45 DPX, 50 mM Tris-HCl) resuspendiert und mit NaOH auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nanoerythrozyten wurden nach einer modifizierten Methode von Lejeune et al. (1994) präpariert. Ghosts wurden durch sechs aufeinanderfolgende Extrusionen durch 25 mm Polycarbonatfilter mit 1  $\mu\text{m}$  Porengröße (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA) mit Stickstoff erhalten. Der Extruder (Extruder<sup>TM</sup>, Lipex Membranes Inc., Vancouver, Canada) wurde auf 37 °C temperiert. Die geschlossenen Ghosts und Nanoerythrosomen wurden von dem nicht eingeschlossenem Material wie die Liposomen (Kap. 3.7.) mittels Chromatographie über eine G-75 Säule mit Tes-Puffer abgetrennt. Der gleiche Puffer aber mit 0.1 mM EDTA wurde für den Leakage-Assay genutzt.

### *3.9. Leakage-Assay*

Die Leakage-Messungen wurden mit einem Shimadzu RF5001PC Spektrofluorometer (Duisburg, Deutschland) bei verschiedenen Temperaturen bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{EX}} = 355 \text{ nm}$  (Spaltbreite 2 nm) und bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{EM}} = 530 \text{ nm}$  (Spaltbreite 4 nm) durchgeführt, die zeitliche Auflösung betrug 0,5 Sekunden. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer. Die Freisetzung des gelösten ANTS/DPX Komplexes aus den Liposomen oder aus dem Lumen der ghosts führt zur Dissoziation des Komplexes und folgend zu einem 'dequenching' der Fluoreszenz des ANTS. Die Steigerung der Intensität der ANTS Fluoreszenz ist der gemessene Leakage. Zur prozentualen Bestimmung des Leakage wurde zum Ende eines jeden Experiments Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben (Endkonzentration 0.1 %, v/v), was zu einer maximalen Verdünnung und Dissoziation des ANTS/DPX Komplexes (entspricht 100% Leakage) führte.

### 3.10. Hämolyse Assay

Die Freisetzung von Hämoglobin aus Schaf-, Katzen-, Ratten-, Maus- und Human-Erythrozyten wurde verwandt, um die zytotoxische Aktivität mittels Mikrotitrations-Technik zu bestimmen. Die lytischen Aktivitäten der Cölomflüssigkeit (25 µl) oder der Fraktionen (25 µl) der Proteinreinigung wurden durch fortlaufende Verdünnung in PBS-Puffer (150 mM NaCl, 5.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), gefolgt von einer Zugabe von 25 µl Erythrozyten (10<sup>8</sup> Zellen/ml), gemessen. Der Titer wurde als reziproker Wert der Verdünnung der Fraktionen angegeben, die noch eine Lyse der Erythrozyten ermöglichen.

Neben der Tirationstechnik wurde die hämolytische Aktivität über die Absorption des Hämoglobins bei 540 nm bestimmt (Hatakeyama et al., 1995). Gleiche Volumina (100 µl) von in PBS-Puffer verdünnten Eiseniapore (da Konzentrationen variieren, erfolgt die Konzentrationsangabe im jeweiligen Kapitel *Ergebnisse*) und einer 10 % (v/v) Erythrozytensuspension in gleichen Puffer, wurden nach der Inkubation, wenn nicht anders beschrieben, 10 min zentrifugiert (20000 x g). Die Lyse wurde bestimmt, indem die Absorption des Überständen vermessen wurde (Zeiss PMQ Spectrophotometer, Oberpfaffenhofen, Deutschland). Alle Messungen wurden auf den Leerwert (PBS-Puffer) korrigiert, die 100% Lyse wurde durch Zugabe von 0,003% (Aldrich, Steinheim, Deutschland) bestimmt.

Der Komplementtiter des Serums von Meerschweinchen wurde in Barbiturat-Gelantine-Puffer als Immunchämolyse bestimmt. Entsprechend dem internationalen Standard wird diejenige Menge Serum ermittelt, die eine 50%ige Hämolyse herbeiführt. Die hier verwandte Methode folgte den WHO Richtlinien zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität von Komplement (Friemel, 1991), die Mengen- und Konzentrationsangaben wurden diesen Vorschriften entsprechend in g/l und ml angegeben.

*Lösungen.* Stammlösung A: Na-5,5-diethylbarbiturat (5,1 g/l), NaCl 41,5 g/l, 1n HCl (17,3 ml), MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,51 g/l), CaCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (0,164 g/l); Stammlösung B: 1g Gelatine in 800 ml A.dest; Gebrauchslösung (Barbituratpuffer): 1 Volumenteil Stammlösung A und 4 Volumenteile Stammlösung B mischen und pH 7,4 einstellen. Das zu untersuchende Serum wird ohne antikoagulierende Substanzen, wie z.B. Heparin entnommen, eine Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann 10 min bei 1400 x g, 4°C, zentrifugiert. *Adsorbieren des Meerschweinchen-Serums:* 9 ml einer 1:10 (in Barbituratpuffer) verdünnten Serum Mischung werden mit 1 ml Sediment aus Hammelerythrozyten bei 4°C inkubiert. *Amborzeptortitration:* Die Komplementlyse wird über Antikörper vermittelt. Darum müssen die Zielzellen (Erythrozyten) erst mit einem Antikörper (Hämolysin oder Amborzeptor) sensibilisiert werden. Die Titration des Hämolysins gegen Schaferythrozyten erfolgte in einer Mikrotiterplatte, in die jeweils 25 µl Barbituratpuffer

pro Titerloch ausgetropft wurden. In diesem Puffer wurde eine 1:50 Verdünnung (in Barbituratpuffer) des Amborzeptors (Sächsisches Serumwerk, Dresden, Deutschland) titriert, gefolgt von 25 µl einer Erythrozytensuspension ( $5 \times 10^8$  Zellen/ml) und der gleiche Menge einer 1:200 Barbituratpuffer-Verdünnung des Serums. Die Platte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Amborzeptorverdünnung, die gerade noch zu einer Lyse führt, wird als "hämolytische Einheit" bezeichnet. Die Sensibilisierung der Erythrozyten erfolgt durch Mischen gleicher Teile aus Erythrozytensuspension und einer Amborzeptor-verdünnung, die zwei hämolytischen Einheiten entspricht. Der Ansatz wird 30 min (37°C) inkubiert und sofort verwandt. *Komplementtitration:* Serum wird in Barbituratbuffer einer geometrische Verdünnungsreihe titriert. Die dann zugefügten 25 µl der sensibilisierten Hammelerythrozyten und 25 µl des Barbituratbuffer werden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Auswertung der Platte erfolgt entweder durch direktes Betrachten oder unter einem Lesegerät (siehe auch: Friemel, 1991).

### 3.11. Charakterisierung von membranbindungs- und lytischer Aktivität von Eiseniapore

Um die Membranbindung und lytische Aktivität von Eiseniapore an Schafererythrozyten zu charakterisieren, wurde der Einfluß von 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1,5 mM Ca, 1,5 mM Mg, 1 mM Cu, 150 I.E. Heparin, 0,4µM Vitronectin und 0,5 mol% Lyso-PC mittels zweier Methoden untersucht: (i) *Membranbindung von Eiseniapore:* Bei der Inkubation (30 min) von Eiseniapore mit Schafererythrozyten bei 0°C erfolgt nur eine Bindung an die Targetmembran, eine lytische Aktivität ist bei dieser Temperatur nicht feststellbar. Die Bindungsreaktion von Eiseniapore und Membran wurde in Gegenwart der oben aufgeführten Ionen und Substanzen getestet. Die Erythrozyten wurden anschließend mit eiskaltem (0°C) PBS-Puffer (150 mM NaCl, 5.8 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) gewaschen, um das ungebundene Protein zu entfernen. Die Bindung Eiseniapores wurde durch Hämolysen (siehe Hämolysen-Assay, Kap. 3.11.) nach Inkubation (30 min) bei 37°C bestimmt. (ii) *Lytische Aktivität von Eiseniapore:* Eiseniapore wurde zwecks Bindung an die Membran bei 0°C für 10 min mit Erythrozyten inkubiert und gewaschen (0 °C). Eine Lyse der Erythrozyten konnte bei diesem Schritt nicht festgestellt werden. Der Eiseniapore-Erythrozyten-Komplex wurde dann bei 37°C unter Anwesenheit der oben angeführten Ionen und Substanzen für 30 min inkubiert. Nachfolgend wurde die Eiseniapore-induzierte Hämolysen bestimmt.

### 3.12. Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz

Die Fluoreszenz wurde bei 25 °C mit einem Aminco Bownman Series 2 Luminescence Spektrometer (Rochester, NY, USA) unter Verwendung einer 10 mm Quartzküvette gemessen. Die Lösungen wurden bei Durchmischung mit einem Magnetrührer zwei Minuten temperiert. Die

Intensität der Proteinfluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{EM} = 336$  nm (Spaltbreite 4 nm) gemessen, die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{EX} = 286$  nm (Spaltbreite 2 nm). Die Spektren wurden jeweils viermal akkumuliert und mit dem Algorithmus des Softwareprogrammes des Spektrometers geglättet. Die in Proteinabwesenheit bestimmte Hintergrundintensität wurde subtrahiert. Die Lage der Maxima wurde durch Differenzieren (TableCurve 2D, Algorithmus: Savitzky-Golay) der Fluoreszenzkurven ermittelt.

### *3.13. Elektronenmikroskopie*

Membranen der Vesikel oder ghosts wurden in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Eiseniapore mit 1% Glutaraldehyd bei Raumtemperatur vorfixiert. Die Vorfixierung wurde nach 10 min durch Zugabe von 1 M Tris-HCl, pH 7,4, gestoppt. Die Proben wurden auf einen doppelten Karbonfilm gelegt und mit 1% Phosphorwolframsäure, pH 7.0 fixiert. Zur Unterstützung wurden Kupfergrids (400 Maschen), die mit einem Karbonfilm überdeckt waren, benutzt. Die so vorbereiteten Proben wurden mit einem EM 400T Elektronenmikroskop (Phillips, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV und einer Vergrößerung von 60.000x und 80.000x aufgenommen.

### *3.14. Circular dichroismus/CD-Spektroskopie*

Das CD-Spektrum wurde in geschmolzenen Silikazellen mit 1 mm Schichtdicke mit einem JASCO J-720 Spektropolarimeter aufgezeichnet. Die Temperatureinstellung erfolgte über ein Wasserbad. Das Spektropolarimeter war mit einem PC für die Datenaufnahme und -auswertung verbunden. Das Spektrum wurde in Bereich von 195 nm bis 250 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 10 nm/min aufgenommen. Für ein Spektrum wurde die Probe dreimal gescannt. Für die Datenverarbeitung der Spektren wurde die Grundlinie subtrahiert, um anschließend mit der zum Spektropolarimeter gehörenden Software die so bearbeitenden Spektren auszuwerten. Die Proteinkonzentration betrug 3  $\mu$ M in PBS-Puffer, pH 7.2.

### 3.15. Osmotische Experimente

Der effektive Innendurchmesser der Proteinpore, die durch Eiseniapore gebildet wurde, kann mit Hilfe von Schafer erythrozyten unter Verwendung der von Bhakdi et al. (1984) und Moran et al. (1992) gewonnenen Daten über die Größe von Protektoren, bestimmt werden. Schafer erythrozyten (2%, v/v) wurden in PBS-Puffer suspendiert, dem jeweils 30 mM der folgenden Substanzen zugesetzt wurde: Sucrose (effektiver molekularer Durchmesser: 0.9 nm), Raffinose (1.3 nm), Dextran 4 (3 nm), Inulin (3.5 nm), Polyethylenglycol 4000 (4 nm). Nach 30 min Inkubation (37°C) wurden 25 µl der mit Protektor behandelten Erythrozyten auf die 25 µl in einer Mikrotiterplatte titrierten Eiseniaporesuspension (Ausgangskonzentration: 5 µg/ml) gegeben. Die Hämolyse wurde nach 30 min Inkubation bei 37 °C bestimmt. Als Kontrolle, ob die verwandten Protektoren Eiseniapore direkt beeinflussen, galt folgender Test: Die Zellen wurden mit dem Puffer gewaschen, der die Protektoren enthielt, und anschließend in Protektoren-freiem Puffer resuspendiert. Bei allen im Test verwandten Protektoren war eine sofortige Lyse der Zellen nachweisbar, so daß geschlußfolgert werden kann, daß weder Inulin, Dextran oder PEG die Bindung von Eiseniapore an die Membran beeinflussen.

### 3.16. Immunoblot-Analyse (Westernblot)

Das Immunoblotting wurde mit der 'semi-dry' Technik des Bio-Rad Transblott (Bio-Rad, California, USA) durchgeführt. Die elektrophoretisch separierten Komponenten wurden vom SDS-Gel mit 3 mA/cm<sup>2</sup> über 60 min in Tris/Glycin/Methanol Puffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin) auf Nitrocellulose bei Raumtemperatur transferiert.

Die Nitrocellulosemembranen wurde in 10% fettfreier Milch (60 min, 24°C) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Für die immunchemische Detektion wurde die Nitrocellulosemembran mit den primären Antikörpern (anti-C9 und anti-Vitronectin Antikörper) für 12 h bei 4°C inkubiert und dann in einer 60 minütigen Reaktion mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörpern (SIFIN GmbH, Berlin, Deutschland) bei Raumtemperatur behandelt und anschließend mit einem Enzymsubstrat (10 mg/ml O-Phenyldiamin in Methanol 1:100 und mit 0.03% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst (alles Serva, Heidelberg, Deutschland)) entwickelt.

### 3.17. ESR Messungen

Um die Membranfluidität der Liposomen zu charakterisieren, wurde das ESR Membranspektrum der spinmarkierten Fettsäuren I(12,3) (5-doxyl-Stearinsäure, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt. Die paramagnetische NO-Gruppe befindet sich in dem hydrophoben Membranbereich der Kopfgruppenregion der Lipide. Die Konzentration der spinmarkierten Fettsäuren betrug 1 mol% der endogenen Lipide.

Die Spektren wurden mit einem Bruker ECS 106 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) gemessen. Das Gerät war mit einer Temperaturkontrolle ausgestattet. Über die Spektren wurde der Ordnungsparameter bestimmt, der als Maß der Membranfluidität herangezogen werden kann (Marsh, 1981). Eine Zunahme der Fluidität bedingt eine Abnahme dieses Parameters. Der Ordnungsparameter  $S$  wurde wie folgt bestimmt:

$$S = \frac{(A_{II} - A_I)}{(A_{ZZ} - A_{XX})} \frac{a_0}{\frac{1}{3}(A_{II} + 2A_I)}$$

mit  $A_{II}$  und  $A_I$  als äußerer und innerer Hyperfeinaufspaltung des Spektrums.  $A_{ZZ}$  (33 G) und  $A_{XX}$  (6,95 G) sind die Hyperfeintensoren und  $a_0$  (15,10 G) ist die isotropische Hyperfeinkopplungskonstante (Schreier et al., 1978).

### 3.18. Sequenzierung Eiseniapore

Eiseniapore wurde mit eiskaltem Ethanol gefällt und das erhaltene Präzipitat mit eiskaltem Ethanol (80%) gewaschen. Der so erhaltene Rückstand wurde für die PAGE im Probenpuffer gelöst und über ein 10% Tris/Tricin Gel (0,75 mm, 6 x 9 cm für eine Stunde bei 30 V und weitere 1,7 Stunden bei 30 mA in einer Mini Protean II Zelle (BioRad) nach Schagger und von Jagow (1987) aufgetrennt. Unmittelbar nach der Trennung wurde ein 'semi-dry' Transfer (Trans-Blot SD Transfer Zelle (BioRad, CA, USA)) auf eine ProBlott<sup>TM</sup> Membran durchgeführt. Für den Transfer wurde 10 mM CAPS Puffer/10% (v/v) Methanol, pH 11 verwendet. Die Blottingzeit betrug 1,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup>. Die Membran wurde für eine Minute mit Coomassie Blue gefärbt, danach in 50% (v/v) Methanol entfärbt und getrocknet. Die anschließende spezifische enzymatische Spaltung der Eiseniapore Blotbande erfolgte mit Lys-C (Boehringer, Mannheim, Deutschland) nach Fernandez et al., 1994: 1% (v/v) hydrogeniertes Triton X 100 wurde in dem Spaltpuffer (0,1M Tris/HCl/10% (m/v) Acetonitril, pH 8,45) mit einer zerschnittenden Eiseniapore Blotbande (1 mm<sup>2</sup>) gegeben. Die Spaltungsdauer unter Verwendung von 2 µg Lys-C in 60 µl Spaltpuffer betrug 22 h bei 37°C unter leichtem Schütteln der Lösung. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Ansäuern mit 10% Trifluoressigsäure. Die so erhaltene Lösung wurde direkt über die Probenschleife auf eine Umkehrphasen-Säule (mRPC C2/C18; SC2,1/10 Säule (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden)) injiziert und in einer HPLC

Anlage (SMART, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) aufgetrennt. Lösung A 0.1 % (v/v) TFA in A. dest, Lösung B 0.1% (v/v) TFA in Acetonitril. Der verwendete Gradient: Start bis 5 min, 5% Lösung B; 5 min bis 65 min Erhöhung auf 45% Lösung; 45 min bis 110 min, 90% Lösung B; 110 min bis 125 min konstant 90% Lösung B. Die Flußrate betrug 100 µl/min. Für die N-terminale Peptid-Sequenzierung wurden die einzelnen RP-HPLC Fraktionen direkt auf ein mit Polybren beschichtetes Glasfiber-Filter getropft und in einem automatischen Proteinsequenzierer (Model 477A/120A, Applied Biosystems, Clifton, USA) abgebaut. Die gefundenen N-terminalen Sequenzen wurden unter Verwendung des FASTA Programms und der Swissprot-Datenbank einer Recherche unterzogen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Reinigung und Charakterisierung eines hämolytischen Proteins aus der Cölomflüssigkeit *E. f. fetidas*

#### 4.1.1. Die Isolation des hämolytischen Faktors mittels präparativer Elektrophorese zeigt ein 38 kDa Protein

Eiseniapore wurde aus der Cölomflüssigkeit *Eisenia fetida fetidas* mittels präparativer, nativer Polyacrylgelelektrophorese (PAGE) isoliert. Die Cölomflüssigkeit (1.2 ml) mit einer Proteinkonzentration von 6,9 mg/ml wurde auf das Sammelgel der PAGE geladen. Der Elutionspufferfluß startete, als die Comassie-Blue Bande das Ende des Gels erreichte. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml gesammelt (Abb. 4.1.). Die Ausbeute betrug 130,2 % (siehe *Diskussion*) mit einem Reinigungsfaktor von 86,5 (Tabelle 4.1.). Die Proteinkonzentration des isolierten Proteins (Eiseniapore) betrug 5 µg/ml bei der Bestimmung mit Bradford-Reagenzien. Im Titrationsassay in PBS-Puffer (pH 7,4, 24 °C) lag die lytische Aktivität bei 64 hämolytische Einheiten (HU) pro Milliliter. Es konnte mit der SDS-PAGE bestätigt werden, daß das Protein bis zur Homogenität gereinigt wurde (Abb. 4.12). Das über Gewichtsmarker bestimmte Molekulargewicht Eiseniapores lag bei 38 kDa.

**Tabelle 4.1.** Ein-Schritt Reinigung Eiseniapores

| Material               | Protein<br>(total)<br>mg | Aktivität<br>u/ml | Aktivität<br>(total)<br>u | spezifische<br>Aktivität<br>u/mg | Aus-<br>beute<br>% | Reinigungs-<br>faktor |
|------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Cömlom-<br>flüssigkeit | 8,28                     | 1024              | 1229                      | 148                              | 100                | 1                     |
| Eisenia-<br>pore       | 0,125                    | 64                | 1600                      | 12800                            | 130,2              | 86,5                  |

Die hämolytische Aktivität Eiseniapores war bei 4 °C für 4 Tage stabil. Im lyophilisiertem Zustand kann das Protein für 15 Monate bei -20 °C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.



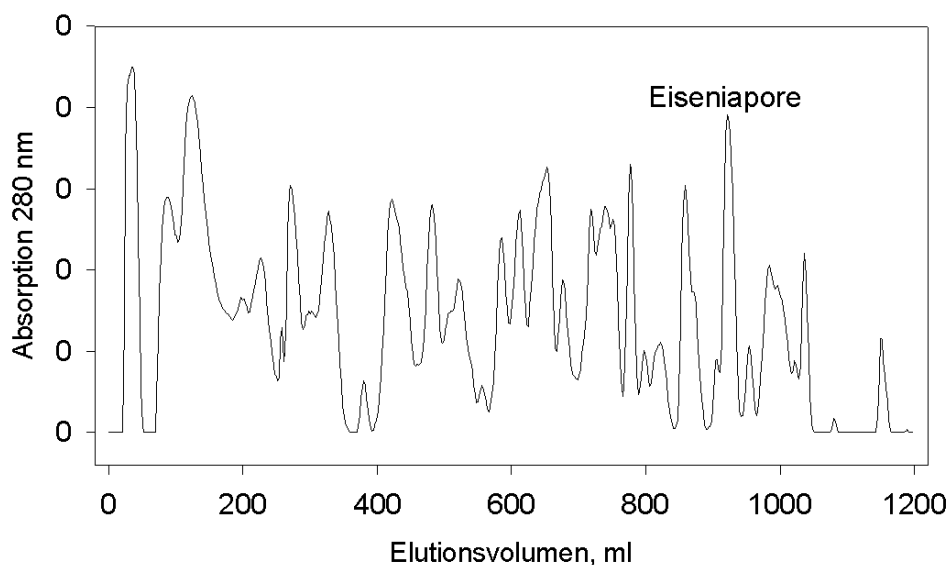


Abbildung 4.1. Elutionsprofil der kontinuierlichen Elutions-Elektrophorese. Der Elutionspuffer enthielt reduzierende Agentien, um die lytische Aktivität Eiseniapore zu schützen. Probe: 8,28 mg Proteinsuspension aus der Cöloflüssigkeit für die Reinigung von Eiseniapore. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Weitere Details beschrieben in *Material und Methoden*.

#### 4.1.2. Sequenzdaten Eiseniapore nach Spaltung mit einer Endopeptidase

Die Sequenzierung des N-Terminus Eiseniapore war nicht möglich, da dieser blockiert war. Deshalb wurde, wie in *Material und Methoden* beschrieben, Eiseniapore elektrophoretisch getrennt, geblottet und anschließend gefärbt. Nachfolgend wurde Eiseniapore aus den luftgetrockneten Blottingmembranen herausgeschnitten.

Aus den so gewonnenen Stücken ( $1 \text{ mm}^2$ ) der Blottingmembran wurde Eiseniapore spezifisch mit Lys-C enzymatisch gespalten und in einer HPLC aufgetrennt. Die Fragmente (Tab. 4.2) wurden in einem Proteinsequenzer für die N-terminale Peptid-Sequenzierung abgebaut und einer Datenbankrecherche (FASTA und Swissprot) unterzogen. Von den mit Lys-C gewonnenen 12 Fragmenten waren fünf blockiert (nicht in der Tabelle gezeigt). Es kann vermutet werden, daß sie der Region des N-Terminus von Eiseniapore entstammen.

**Tabelle 4.2.** Interne Sequenzdaten von Eiseniapore nach Spaltung mit der spezifischen Endopeptidase Lys-C

| Sequenz                                 | Datenbankrecherche                                  |
|---|---|
| Lys-Gly-Ile-Gln-Gly-Gly                 | Serin Carboxypeptidase<br>(E.C. 3.4.16.5)           |
| Lys-Ala-His-Phe-Lys                     | Globin C aus <i>L. terrestris</i>                   |
| Lys-Val-Asp-Ser-Pro-Glu-Ser             | Lipoxygenase (E.C. 1.13.11.12)                      |
| Lys-Arg-Val-Asp-Ile-Glu-His-Pro-Glu     | Globin C aus <i>L. terrestris</i>                   |
| Lys-Ile-Pro-Asp-Asn-Tyr-Phe-Asp-Ala-Phe | Globin AIII aus <i>L. terrestris</i>                |
| Lys-Ile-Gly-Phe-Gly-Arg-Leu-Leu-Leu-Thr | Globin C aus <i>L. terrestris</i>                   |
| Lys-Glu-Ile-Pro-Glu-Val-Ala-Asp-Leu-Phe | Globin C aus <i>L. terrestris</i> und<br>Protein C9 |

#### 4.1.3. Die Interaktion Eiseniapores mit Erythrozyten verursacht Agglutination und Lyse

Unter Verwendung von Formaldehyd-fixierten Erythrozyten konnte eine agglutinierende Aktivität von Eiseniapore nachgewiesen werden. Die höchste agglutinierende Aktivität ist mit einem Titer von 1:256 bei Humanerythrozyten (Tabelle 4.3) geringer als die schwächste lytische Aktivität (1:2530) bei Mäuserythrozyten. Deshalb wird sie im Titrationsassay bei Verwendung nicht fixierter Erythrozyten überdeckt. Eiseniapore induziert eine deutliche Hämolyse von Erythrozyten unterschiedlicher Säugerarten. Die Sensitivität der Erythrozyten gegen die lytische Aktivität Eiseniapores fällt in folgender Ordnung: Schaf-, Human-, Katzen-, Ratten- und Mäuseerythrozyten. Der gemessene Hämolysetiter korreliert mit dem Sphingomyelinanteil der Targetmembranen der verwendeten Erythrozyten (Abb. 4.2). Schaferythrozyten mit ihrem Anteil von 51% Sphingomyelin werden mit einem Titer von 1:8192 lysiert. Bei dem geringeren Sphingomyelinanteil von 12.1% in der Membran der Mäuseerythrozyten liegt die durch Eiseniapore induzierte Lyse bei einem Titer von 1:2530.

**Tabelle 4.3.** Hämagglutinierende Aktivität von Eiseniapore an fixierten Erythrozyten (n=5)

| Species                       | Agglutinationstiter |
|-------------------------------|---------------------|
| <i>Ovis domestica</i> (Schaf) | 1:32                |
| <i>Homo sapiens</i> (Mensch)  | 1:256               |
| <i>Felis libyca</i> (Katze)   | 1:16                |
| <i>Rattus rattus</i> (Ratte)  | 1:128               |
| <i>Mus musculus</i> (Maus)    | 1:16                |

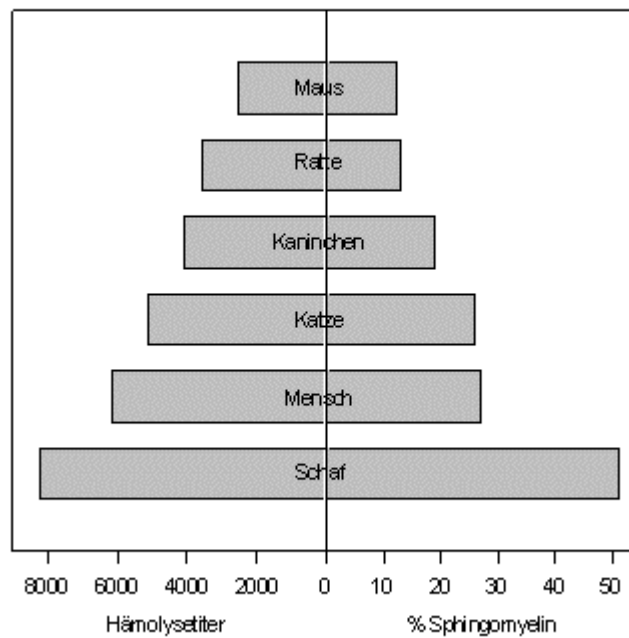


Abbildung 4.2. Hämolyse von Erythrozyten verschiedener Säugetierarten induziert durch Eiseniapore. Der hämolytische Titer wurde mit Mikrotitrations-Assay untersucht. Der Hämolyse-Titer wurde als reziproker Wert der Verdünnung angegeben, die noch eine Hämolyse induziert (ausführlich in *Material und Methoden*). Der Anteil an Sphingomyelin der Erythrozyten (Fehrenbach und Jürgens, 1991) ist in Relation zu der lytischen Aktivität von Eiseniapore gezeigt.

#### 4.1.4. Charakterisierung der hämolytischen Aktivität von Eiseniapore

Die Charakterisierung der stärksten Aktivität Eiseniapores, die lytische Wirkung auf Erythrozyten, erfolgte nach dem von Suelter (1990) ausgearbeiteten Schema der Proteincharakterisierung. Diese ursprünglich für die Planung eines Reinigungsschemas ausgearbeitete Prozedur wird heute vor allem für die Charakterisierung von Proteinen herangezogen (siehe *Diskussion*).

Diese Charakterisierung beinhaltet die Bestimmung der Aktivität des gereinigten Proteins in der Gegenwart von Ethanol (20 %, v/v), Mercaptoethanol (50 mM), Glycerol (25 %, v/v), EDTA oder EGTA (10 mM), KCl oder NaCl (0.2 M), KSCN oder NaSCN (2 M). Außerdem wird zusätzlich die Wirkung ausgewählter Metallionen (10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 mM  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , 5 mM  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  und 3 nM  $\text{Au}^{3+}$ ) und Anionen (5 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  und  $\text{CO}_3^{2-}$ ) auf die Aktivität Eiseniapores untersucht.

Die Hämolyseaktivität Eiseniapores wurde an Schaferythrozyten bestimmt, da diese Erythrozyten die höchste Sensitivität gegen Eiseniapore zeigten (Kap. 4.3). Das Protokoll nach Suelter (1990) verlangt vor der Aktivitätsbestimmung eine Vorinkubation des gereinigten Proteins (Eiseniapore) mit den oben erwähnten Substanzen und Ionen für 0,5 h bei jeweils 4 °C und 37 °C (Tabelle 4.4). Beide Temperaturen sind nicht physiologisch, sie wurden genutzt, um dem Protokoll von Suelter (1990) zu folgen, da so die Möglichkeit des Vergleichens mit anderen Proteinen besteht. Um nicht nur den Einfluß dieser Substanzen auf die hämolytische Aktivität Eiseniapores zu testen, sondern auch die Stabilität in Gegenwart der Substanzen zu analysieren, ist außerdem noch eine längere Inkubation für 24 h - ebenfalls bei den beiden Temperaturen 4 °C und 37 °C - vorgesehen (Suelter, 1990). Der Kontrollwert der 100%-igen Lyse wurde durch Zugabe von (Endkonzentration 0,003%) unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen bestimmt.

Die Inkubationen zeigten die starke Temperaturabhängigkeit der lytischen Wirkung Eiseniapores (Tab. 4.4a). Nach einer halben Stunde Inkubation bei 4 °C und 37 °C liegt die lytische Aktivität bei 22%<sup>21</sup> beziehungsweise 75% (Kontrolle: 100% Lyse bei Saponin Zugabe). Erfolgt die Inkubation über einen Zeitraum von 24 h, zeigt sich, daß Eiseniapore bei 4 °C stabil ist (25% lytische Aktivität), aber bei 37 °C einen Teil seiner lytischen Aktivität, die dann nur noch 12% beträgt, einbüßt. Glycerol schützt Eiseniapore vor dieser teilweisen Inaktivierung über 24 h bei 37 °C (siehe Tabelle 4.4a). Eiseniapore ist bei den untersuchten Temperaturen (4 °C und 37 °C) sowohl nach 0,5 h als auch nach 24 h resistent gegen Ethanol, es verliert seine hämolytische Aktivität nicht. Die Aktivität wurde weder nach 0,5 h noch nach 24 h bei den untersuchten Temperaturen durch die Gegenwart von 0,2 M NaCl beziehungsweise KCl beeinflusst. Eine Erhöhung der lytischen Aktivität Eiseniapores konnte in Anwesenheit von SH-Gruppen nachgewiesen werden: nach 0,5 h (37 °C) steigerte sich die Aktivität in Gegenwart von 50 mM Mercaptoethanol von 75% (Kontrolle) auf 93%. EDTA oder EGTA verminderten die Aktivität von

---

<sup>21</sup>Im Text erscheinen die gerundeten Werte, in der Tabelle sind die *nicht* gerundeten Werte aufgeführt.

Eiseniapore erst nach einer Inkubation von 24 h; bei 4 °C vermindert die Anwesenheit von EDTA wie auch EGTA die lytische Aktivität auf 13%, die in Abwesenheit dieser Substanzen bei 25% lag (siehe oben). Bei der höheren Temperatur (37 °C) verursacht die Gegenwart von EDTA beziehungsweise EGTA einen Rückgang der Hämolyseaktivität auf 3 %.

Neben den bereits in der Substanzgruppe Salze (KCl, NaCl, KSCN und NaSCN) untersuchten Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen wurde der Einfluß weiterer Metallionen ermittelt. Die Stabilität Eiseniapores wurde in Anwesenheit der Metallionen Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> weder bei 4 °C noch bei 37 °C beeinflusst. Die zum Test verwandten Metallionen hatten bei der Temperatur von 4 °C im Verlauf der kurzen Inkubation von 0,5 h keinen Einfluß<sup>22</sup>.

---

<sup>22</sup>Die Daten über die Wirkung der Metall-Ionen auf die Aktivität eines Proteins gehören nicht zum ursprünglichen Protokoll nach Suelter (1990). Sie sind deshalb sinnvoll, da die meisten Hämolysine der Invertebraten, so auch die Hämolysine von *Eisenia fetida andrei* (Roch et al., 1989), über die Wirkung einzelner Metall-Ionen beschrieben wurden und so eine vergleichende Betrachtung ermöglichen. Diese Resultate werden in der *Diskussion* ausführlich besprochen.

**Tabelle 4.4a.** Charakterisierung Eiseniaporen (nach Suelter, 1990) (n=7)

| <b>hämolytische Aktivität Eiseniaporen (%)</b> |                             |             |                            |                          |
|--|-----------------------------|-------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>nach</b>                                    |                             |             |                            |                          |
| <b>Eiseniapore behandelt mit</b>               | <b>0,5 h Inkubation bei</b> |             | <b>24 h Inkubation bei</b> |                          |
|  | <b>4°C</b>                  | <b>37°C</b> | <b>4°C</b>                 | <b>37°C<sup>23</sup></b> |
| Puffer   | 21,8                        | 74,9        | 24,4                       | 11,9                     |
| 2-Mercaptoethanol 50 mM                        | 26                          | 92,6        | 37,6                       | 19,6                     |
| EDTA oder EGTA 10 mM                           | 21,25                       | 72,7        | 13                         | 3                        |
| Glyzerol 25%                                   | 21,9                        | 71,5        | 35                         | 29,7                     |
| Ethanol 20%                                    | 24                          | 73,5        | 23                         | 11                       |
| KCl oder NaCl 0,2 M                            | 21,3                        | 72          | 19,1                       | 10,4                     |
| KSCN oder NaSCN 2 M                            | 22,1                        | 65,6        | 18,4                       | 5,9                      |

<sup>23</sup>Die Temperaturen folgen dem Protokoll von Suelter (1990), um einen Vergleich mit anderen Proteinen zu ermöglichen (die Temperaturen sind nicht physiologisch).

**Tabelle 4.4b.** Einfluß von Metallionen auf die hämolytische Aktivität Eiseniapore

| Eiseniapore behandelt mit | hämolytische Aktivität Eiseniapore (%) |      |                     |      |
|---------------------------|--|------|---------------------|------|
|                           | nach                                   |      |                     |      |
|                           | 0,5 h Inkubation bei                   |      | 24 h Inkubation bei |      |
|                           | 4°C                                    | 37°C | 4°C                 | 37°C |
| Puffer                    | 21,8                                   | 74,9 | 24,4                | 11,9 |
| Fe <sup>2+</sup> 2 mM     | 19,5                                   | 40,4 | 14,6                | 6,5  |
| Fe <sup>3+</sup> 2 mM     | 18,7                                   | 42   | 9,1                 | 2,7  |
| Ni <sup>2+</sup> 2 mM     | 20,3                                   | 18   | 11,7                | 7,4  |
| Co <sup>2+</sup> 2 mM     | 16,4                                   | 39,2 | 11,4                | 4,6  |
| Zn <sup>2+</sup> 5 mM     | 22                                     | 43   | 12                  | 2,3  |
| Cu <sup>2+</sup> 5 mM     | 21,6                                   | 50,8 | 8                   | 5,4  |
| Au <sup>3+</sup> 3 nM     | 19,2                                   | 10,1 | 0                   | 0    |

Es konnten nachgewiesen werden, daß die lytische Aktivität Eiseniapore in Gegenwart von Eisen-Ionen unterdrückt wird, wobei die inhibierende Wirkung von Fe<sup>3+</sup> höher als die von Fe<sup>2+</sup> ist, was auf eine oxidative Zerstörung der lytischen Aktivität hinweist (Tab. 4.4b). Die inhibitorische Wirkung von Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> war komplett durch Mercaptoethanol unterdrückbar, da dessen reduzierende Aktivität vermutlich vor der oxidativen Zerstörung der Metallionen schützte. Eine deutliche Inhibierung der lytischen Aktivität wurde in Gegenwart von sehr geringen Konzentration Au<sup>3+</sup> (3 nM) bereits nach einer halben Stunde Inkubation bei 37 °C beobachtet. Die lytische Aktivität wurde nach 24 h Inkubation in Gegenwart von Au<sup>3+</sup> vollständig zerstört.

Die untersuchten Anionen haben bis auf SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> keinen Einfluß auf die Aktivität Eiseniapore. Sulfat-Ionen hemmen die Hämolyse jedoch erst bei einer Inkubationsdauer von 24 h: 14 % Restaktivität bei 4 °C und 5 % bei 37 °C.

#### **4.1.5. Der Einfluß von Kohlenhydraten auf die hämolytische und hämagglutinierende Aktivität von Eiseniapore ist ein Hinweis auf den Lektincharakter**

Verschiedene Kohlenhydratstrukturen zeigen im Titrationsassay eine Wirkung auf die hämolytische und hämagglutinierende Aktivität von Eiseniapore. Die Kohlenhydrate wurden in einer Konzentration von 0.1 M mit dem Puffer (PBS, pH 7,4) vorgelegt und in Anwesenheit des titrierten Proteins 30 min bei 37°C inkubiert. Das auch als "Zuckerinhibierungstest" bezeichnete Verfahren dient dem Nachweis von Strukturen, die an Proteine binden und so ihre Aktivität beeinflussen. Es wird postuliert, daß die in Lösung vorliegende Kohlenhydratstruktur identisch mit einem potentiellen, gegebenenfalls membranständigen Rezeptor ist. Die Inhibierung der hämolytischen und hämagglutinierenden Aktivität des Proteins - in diesem Falle Eiseniapore - in Anwesenheit dieser Kohlenhydrate gibt einen wichtigen Hinweis auf die Lektin/Lektin-ähnliche Struktur des untersuchten Proteins.

Die hämolytische Aktivität Eiseniapores ist durch folgende Kohlenhydrate hemmbar:  $\alpha_1$ -saures Glycoprotein, Fetuin, Blutgruppensubstanz A, Glycophorin, Mucin und Thyroglobin (Tab. 4.5). Keinen Einfluß der hämolytischen Aktivität konnte in Gegenwart von L-Fucose, N-Acetyl-D-Galactose, D-Galactose, N-Acetyl-D-Glucose, D-Mannose, Melibiose, N-Acetyl-D-Neuraminsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin nachgewiesen werden.

Die agglutinierende Aktivität Eiseniapores wurde durch folgende der getesteten Zucker inhibiert:  $\alpha_1$ -saures Glucoprotein, Fetuin und N-Acetyl-D-Glucosamin. Für zahlreiche bakterielle Hämolysine (siehe *Diskussion*) bildet das Kondensationsprodukt aus Mannosamin und Pyruvat - die Neuraminsäure - den Rezeptor auf der Targetmembran. Deshalb haben wir als Ergänzung zu den Versuchen mit einfachen und komplexen Zuckern, auch Neuraminidase-behandelte Erythrozyten (Schaf) als Targetzellen verwandt. Nach der Behandlung zeigten die Neuraminidase-behandelten Erythrozyten weder eine verminderte oder erhöhte Sensitivität auf die hämolytische und hämagglutinierende Aktivität von Eiseniapore im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.



**Tabelle 4.5:** Einfluß der Kohlenhydrate auf die hämolytische und hämagglutinierende Aktivität von Eiseniapore (n=6)

| <b>Kohlenhydrate</b>              | <b>Inhibition der Titerstufen (%)</b> |                                     |
|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
|                                   | <b>hämolytische Aktivität</b>         | <b>hämagglutinierende Aktivität</b> |
| <sub>1</sub> -saures Glycoprotein | 87,5                                  | 98                                  |
| Fetuin                            | 98                                    | 87,5                                |
| Blutgruppensubstanz A             | 87,5                                  | 0                                   |
| Glycophorin                       | 87,5                                  | 0                                   |
| Mucin                             | 87,5                                  | 0                                   |
| Thyroglobulin                     | 87,5                                  | 0                                   |
| N-Acetyl-D-Glucosamin             | 0                                     | 87,5                                |

#### **4.1.6. Die zwei Schritte der lytischen Wirkung Eiseniapores: die temperaturunabhängige Bindung und die temperaturabhängige lytische Aktivität**

Die lytische Aktivität von Proteinen, z.B. Perforin, kann mit Hilfe von Inhibitoren der Lyse näher beschrieben werden (Ojcius und Young, 1990). Für die Charakterisierung der Bindungs- und lytischen Aktivität Eiseniapores verwandten wir folgende Inhibitoren: Vitronectin/S-Protein, Heparin, lyso-Phosphatidylcholin (lyso-PC) und Metallionen (siehe auch Kap. 4.1.3.).

Wurde Eiseniapore mit den Targetzellen (Schäfererythrozyten) bei 0°C inkubiert, ist keine Hämolyse nachweisbar. Werden die so behandelten Erythrozyten bei 0°C zentrifugiert und gewaschen, um die nicht gebundenen Eiseniapore-Proteine zu entfernen, ist nach einer Temperaturerhöhung auf 37°C (30 min) eine deutliche Lyse feststellbar.

Die Versuchsbedingungen wurden in den folgenden Experimenten so gewählt, daß entweder nur die Bestimmung der Bindungsaktivität oder nur der lytische Aktivität erfolgte.

Es konnte gezeigt werden, daß der Membranbindungsschritt durch Vitronectin, Heparin und

lyso-PC unterdrückt wird (Tab. 4.6 a).  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  wie auch EGTA und EDTA beeinflussen die Bindungsaktivität von Eiseniapore nicht. Die Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  hingegen führt zu einer Erhöhung der Bindungsaktivität (Bestimmung der Bindung über hämolytische Aktivität in *Material und Methoden*).

In den Versuchen mit membrangebundem Eiseniapore - der experimentellen Anordnung, mit der allein die lytische Aktivität bestimmt wurde - zeigte sich, daß  $\text{Cu}^{2+}$  die lytische Aktivität stark unterdrückt. Daß die beiden Schritte (Bindung und Lyse) durch unterschiedliche Faktoren beeinflußt werden, ist ein Hinweis auf unterschiedliche Strukturen/Eigenschaften Eiseniapore, die für Bindung und Lyse verantwortlich sind.

**Tabelle 4.6.a.** Beeinflussung der *Bindung* von Eiseniapore an Erythrozyten durch verschiedenen Substanzen (n=6)

| Bedingungen des hämolytisches Systems |   | hämolytische Aktivität (%) |
|---------------------------------------|---|----------------------------|
| Eiseniapore                           | + Erythrozyten + Puffer   | 76,8                       |
|                                       | + Erythrozyten + EDTA (oder EGTA) 1mM                             | 71,4                       |
|                                       | + Erythrozyten + $\text{Ca}^{2+}$ (oder $\text{Mg}^{2+}$ ) 1.5 mM | 72,2                       |
|                                       | + Erythrozyten + Heparin 150 I.E.                                 | 21,9                       |
|                                       | + Erythrozyten + $\text{Cu}^{2+}$ 1 mM                            | 92,7                       |
|                                       | + Erythrozyten + Vitronectin 0.4 M                                | 15,9                       |
|                                       | + Erythrozyten + ERF 0.4 M  | 2,7                        |
|                                       | + Erythrozyten + lyso-PC 0.5 mol %                                | 18,5                       |

**Tabelle 4.6.b.** Beeinflussung der *lytischen Aktivität* von Eiseniapore durch verschiedenen Substanzen (n=6)

| Bedingungen des hämolytisches Systems |  | hämolytische Aktivität (%) |
|---------------------------------------|--|----------------------------|
| Eiseniapore-Erythrozyt                | + Puffer   | 75,1                       |
|                                       | + EDTA (oder EGTA) 1 mM                            | 69,7                       |
|                                       | + Ca <sup>2+</sup> (oder Mg <sup>2+</sup> ) 1.5 mM | 72,3                       |
|                                       | + Heparin 150 I.E.                                 | 67                         |
|                                       | + Cu <sup>2+</sup> 1 mM                            | 4,6                        |
|                                       | + Vitronectin 0.4 M                                | 70,2                       |
|                                       | + ERF 0.4 M  | 62,4                       |
|                                       | + lyso-PC 0.5 mol %                                | 64,9                       |

Vitronectin und Heparin unterdrücken die lytische Aktivität von bereits gebundenem Eiseniapore nur um ungefähr 5%. Lediglich bei lyso-PC und dem Eiseniapore-regulierende Faktor (ERF) ist mit ungefähr 10% Inhibition eine deutlichere Wirkung nachzuweisen. Die lytische Aktivität ist insgesamt unempfindlicher gegenüber den getesteten Substanzen als die Bindungsaktivität (Tab. 4.6 b). Die getesteten Inhibitoren, auch das natürliche Regulatorprotein Eiseniapore's ERF, beeinflussen demnach verstärkt den ersten Schritt des lytischen Mechanismus' Eiseniapore's - die Bindung an die Targetzelle (siehe *Diskussion*).

## 4.2. Interaktion von Eiseniapore mit Modellmembranen

### 4.2.1. Eiseniapore induziert einen Leakage von Liposomen

Nach der Analyse der Wechselwirkung mit biologischen Zellen (Erythrozyten) untersuchten wir die Aktivität Eiseniapore's auf Modellmembranen. Es konnte keine Eiseniapore-vermittelte Destabilisierung und kein folgender Leakage von Liposomen, die nur aus Phosphatidylcholin (Ei-PC) gebildet wurden, beobachtet werden (Abb. 4.3., Kurve a, pH 7,4, 25 °C, molares Lipid zu Protein Verhältnis (L/P) = 50:1 (mol/mol)). Selbst bis zu einem Lipid/Protein Verhältnis von 10:1 (mol/mol) wurde durch Eiseniapore kein Leakage induziert. Variationen der Temperatur von 10°C bis 37°C und des pH-Wertes von 4.8 bis 8.1 beeinflussten die Stabilität der PC-Membranen in Gegenwart von Eiseniapore nicht. Des weiteren wurde keine Eiseniapore-vermittelte Freisetzung von ANTS/DPX nach Einbau von Phosphatidylserin (PS) und/oder Phosphatidylethanolamin (PE) - bis zu einem Anteil von 50 mol% - in PC-Liposomen beobachtet. Wurde Ei-PC durch Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ersetzt, konnte keine Lyse unter- oder überhalb des Phasenüberganges nachgewiesen werden. Dies belegt, daß der Phasenzustand und/oder die

Membranfluidität der Lipidphase die lytische Aktivität von Eiseniapore nicht bestimmt.

Ein deutlicher, durch Eiseniapore verursachter Leakage wurde an Liposomen in Gegenwart von Sphingomyelin (SM) beobachtet (Abb. 4.3). Bei einem PC/SM Verhältnis von 3:1 liegt das Ausmaß des Leakages nach 7 min ungefähr bei 10% (L/P = 50:1). Eine Erhöhung des Leakage war nachweisbar, wenn das Lipidverhältnis (PC/SM) von 3:1 über 1:1 zu 1:3 steigt (Abb. 4.4, Kurve c und d).

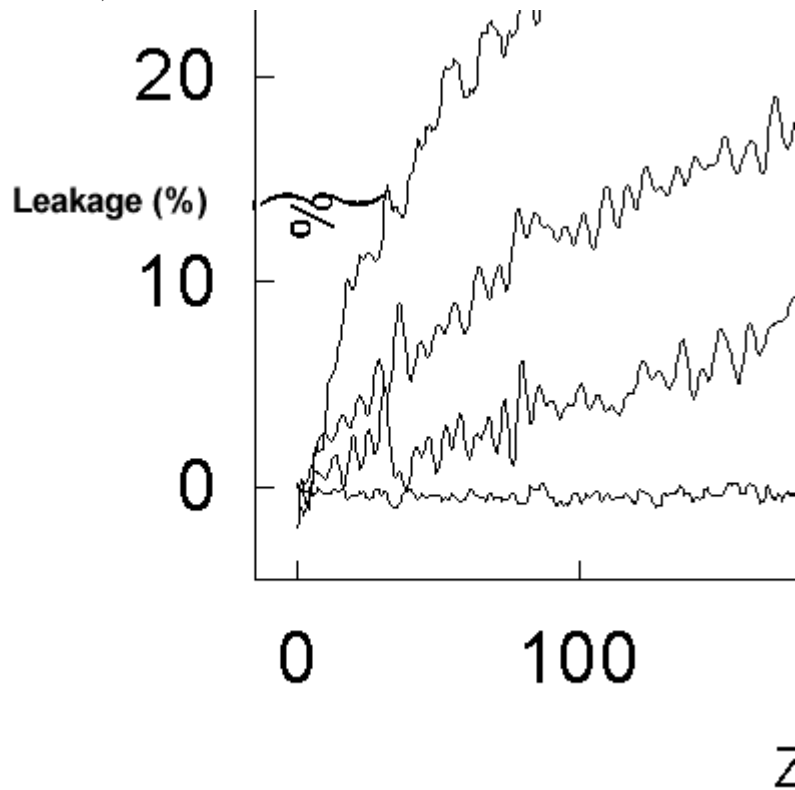


Abbildung 4.3. Eiseniapore-induzierter Leakage von PC/SM Liposomen (SUV) bei pH 7,4, 25 °C, in Tes-Puffer (L/P = 50:1). Der Leakage wurde als Fluoreszenz über die Freisetzung des ANTS/DPX Komplexes, welcher vor der Messung in die Liposomen eingeschlossen wurde, gemessen ( $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ ). Die lytische Aktivität Eiseniapores wurde für verschiedene PC/SM Verhältnisse bestimmt: a, 1:0; b, 3:1; c, 1:1; d, 1:3. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurde das Protein (Endkonzentration 200 nM) zu den Liposomen (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ) gegeben. Um den prozentualen Anteil des Leakage zu bestimmen, wurde zum Ende eines jeden Experiments Triton X-100 gegeben (Endkonzentration 0.1 %), um eine größtmögliche Verdünnung des Fluoreszenzmarkers zu ermöglichen. Details in *Material und Methoden*.

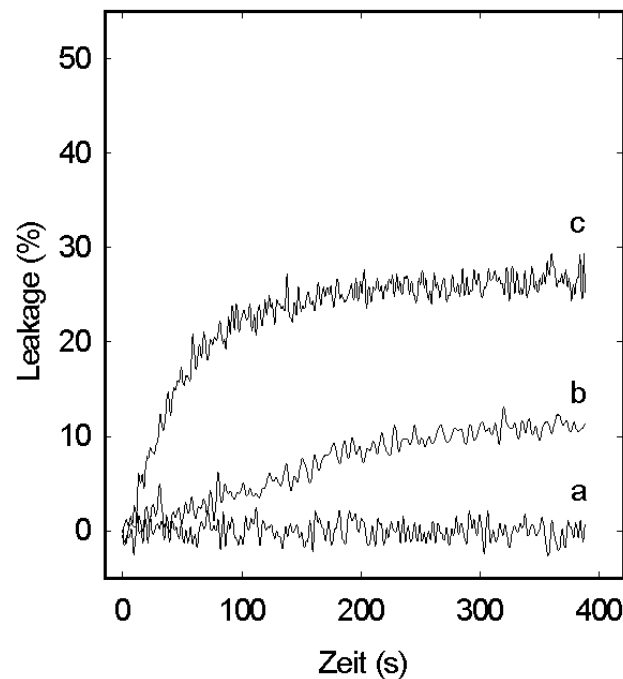


Abbildung 4.4. Eiseniapore-induzierter (Endkonzentration 40 nM) Leakage von Liposomen (SUV, Endkonzentration 10  $\mu$ M) verschiedener Lipidkompositionen bei pH 7,4, 25 °C, in Tes-Puffer (L/P = 250:1). PC/Chol/SM Verhältnisse: a, 1:1:0; b, 1:0:3; c, 1:1:2.

Ein Leakage von SM-haltigen Vesikeln wurde auch bei viel höheren L/P Verhältnissen gefunden (Abb. 4.4, L/P 250:1). Die Destabilisierung von PC/SM-Liposomen durch Eiseniapore war in Gegenwart von Cholesterol bei allen untersuchten L/P Verhältnissen stärker. Sowohl das Ausmaß als auch die Kinetik des Leakages war für Liposomen, die PC/Chol/SM enthielten, erhöht. Kein Leakage wurde hingegen bei PC/Chol-Vesikeln oder PS/PC/Chol-Vesikeln beobachtet.

Da Cholesterol die Membranfluidität beeinflusst, untersuchten wir, ob die Membran-Wechselwirkung von Eiseniapore durch eine Veränderung der Membranfluidität determiniert ist. Später dargestellte Beobachtungen zeigen jedoch, daß das Leakageverhalten nicht durch die Membranfluidität determiniert ist (Tab. 4.7) und bestätigen die bereits dargelegten Ergebnisse, die mit DPPC Liposomen gewonnen wurden.

Das Ausmaß des Leakage von SM haltigen Liposomen durch Eiseniapore ist in starkem

Maße von dem molaren Lipid zu Protein Verhältnis (L/P) abhängig. Sowohl die Kinetik als auch das finale Ausmaß des Leakage waren erhöht, wenn die relative Proteinkonzentration, das heißt, bezogen auf die Lipidmenge, zunahm (gezeigt für PS/PC/Chol/SM (1:1:2:4), Abb. 4.7).

Für die Analyse der Kinetik bestimmten wir die Halbwertszeit des Vesikelleakage. Die Halbwertszeit wurde - bezogen auf das finale Leakageausmaß - an dem Wert der 50%-igen Lyse bestimmt. Die Abhängigkeit dieser Halbwertszeit wurde gegen die inverse Proteinkonzentration ( $1/\text{Konzentration}$ ) aufgetragen. Der so erzeugte Graph folgt in erster Näherung eine linearen Funktion. Wie für PC/SM Liposomen verschiedener Zusammensetzung gezeigt wurde (Abb. 4.5b), ist das gemessene Ausmaß des Leakage auch in diesem Falle eine Funktion des molaren Lipid zu Protein Verhältnisses.

Nach dem Nachweis der hämolytische Aktivität von Eiseniapore (Abb. 4.2), analysierten wir den Leakage von Liposomen, die in ihrer Zusammensetzung der Lipidkomposition von humanen Erythrozyten folgten. Die hauptsächlichen Lipidkomponenten der exoplasmatischen Membran von Humanerythrozyten sind Cholesterol, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin (Op den Kamp, 1979, Zachowski, 1993). Außerdem sind Phosphatidylethanolamin (PE) und Ganglioside (GA) in dem äußeren Membranleaflet enthalten, während sich Phosphatidylserin (PS) fast ausschließlich in der zytoplasmatischen Membran befindet (Zachowski, 1993).

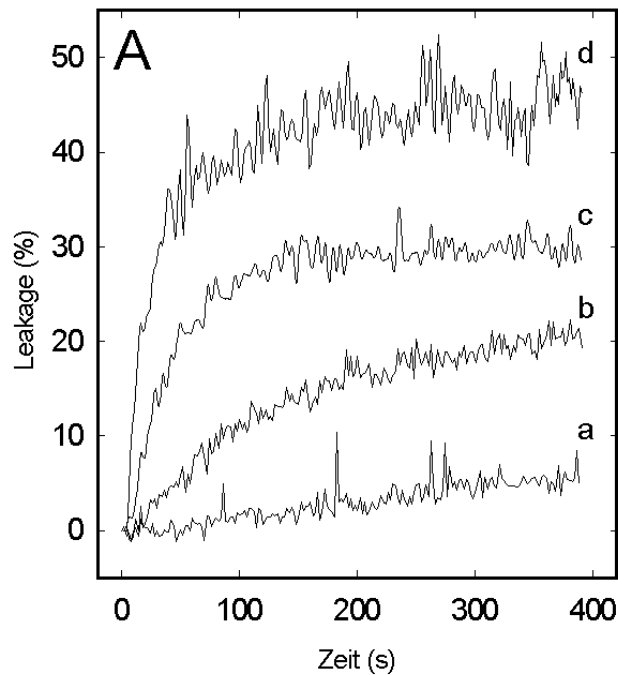
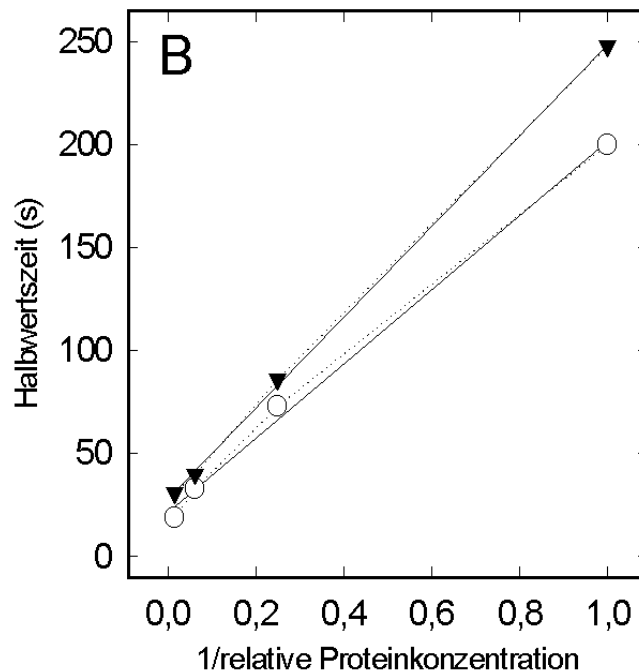


Abbildung 4.5. A, (B, folgende Seite) Kinetiken des Eiseniapore-induzierten Leakages von PS/PC/Chol/SM SUV (1:1:2:4) als eine Funktion des L/P: a, 16000:1; b, 4000:1; c, 1000:1; d, 100:1 (25 °C, Tes-Puffer, pH 7,4).

Um die exoplasmatische Erythrozytenmembran nachzubilden, wurden Liposomen mit der Komposition PC/Chol/SM/PE/GA (12:17:10:3:1) hergestellt. Tatsächlich wurde mit diesen Vesikeln eine hohe lytische Aktivität von Eiseniapore gemessen. Ein L/P von weniger als 260:1 ermöglichte einen Leakage von 40% nach 7 min und 25°C, noch bei 15°C wurde nach gleicher Zeit ein Leakageausmaß von 35% erreicht (Abb. 4.6).



Ab

**bildung 4.5. B,** die Halbwertszeit des Eiseniapore-induzierten Leakage von PS/PC/Chol/SM SUV (○) und von ghosts (▲) als Funktion der inversen relativen Proteinkonzentration (L/P). Die Halbwertszeit korrespondiert mit der Zeit, bei der 50% des vollständigen Leakage gemessen wurden. Die Daten für die Ghosts wurden aus den Kurven in Fig. 6A ermittelt. Die Geraden wurden durch lineare Regression gewonnen.

Es ist bemerkenswert, daß Sphingolipide wie Sphingomyelin essentiell sind, um die lytische Aktivität von Eiseniapore zu ermöglichen. Weder Ganglioside (Monosialoganglioside- $G_{M3}$ , Disialoganglioside- $G_{D1a}$  und Ganglioside [Typ IV] in den Konzentrationen: 0,5 mol%, 2 mol%, 5 mol%, 8 mol% and 10 mol%) noch die Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin konnten Sphingolipide ersetzen. Jedoch konnte die Anwesenheit von Phosphatidylserin in Sphingomyelin-haltigen Liposomen den durch Eiseniapore induzierten Leakage erhöhen.

Um abzuklären, ob die starke Krümmung der SUV notwendig für den Leakage ist, untersuchten wir den Leakage an großen unilamellaren Vesikel (large unilamellar vesicles: LUV). Bei der Verwendung von PS/PC/Chol/SM (1:1:2:4) LUV beobachteten wir, verglichen mit SUV gleicher Zusammensetzung, eine leichte Verminderung des Leakage (Abb. 4.6). Das gibt einen Hinweis darauf, daß die starke Krümmung der Membran, wie sie bei den SUV auftritt, kein notwendiger Faktor für die Destabilisierung der Lipidmembran durch Eiseniapore ist.

Wenn Eiseniapore mit polyklonalen, monospezifischen anti-Eiseniapore Antikörpern vorinkubiert wird, ist kein Leakage von Liposomen feststellbar. Da auch eine Hitzeinaktivierung (56 °C) von Eiseniapore den völligen Verlust der lytischen Aktivität verursacht, belegt dies, daß

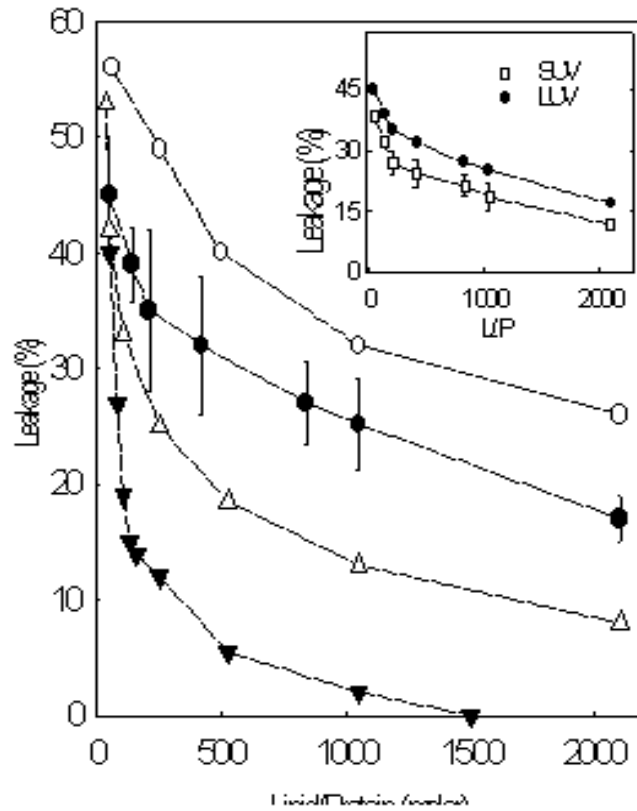


die lytische Aktivität essentiell mit der Wirkung der nativen Konformation Eiseniapore verbunden ist.

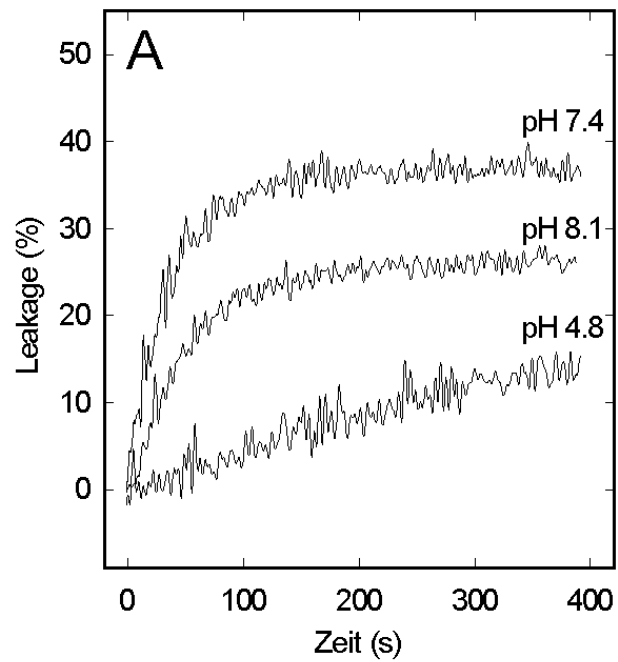
Die Eiseniapore-vermittelte ANTS/DPX Freisetzung Sphingomyelin-haltiger Liposomen ist vom pH-Wert und der Temperatur abhängig. Wie für PS/PC/Chol/SM (1:1:2:4) Vesikel gezeigt wurde, besitzt der liposomale Leakage bei neutralem pH-Wert ein Maximum (Abb. 4.7).

Ein saurer oder ein basischer pH-Wert, pH 4.8 und pH 8.1, verminderten sowohl die Kinetik, als auch das Ausmaß des Leakage. Während die Markerfreisetzung bei 10°C sehr langsam mit geringem Extent erfolgt, wurde sie nach Temperaturerhöhung schneller und erhöhte sich bis 37°C insgesamt. Überhalb von 40 °C nahmen Kinetik und Ausmaß des Leakage wieder ab.

Mittels Dünnschichtchromatographie konnten wir nachweisen, daß eine Destruktion der Lipide in den Zeiträumen der Leakageexperimente nicht stattfindet. Wir haben somit keinen Hinweis auf eine Hydrolyse unter katalytischer Wirkung einer Hydrolaseaktivität von Eiseniapore.

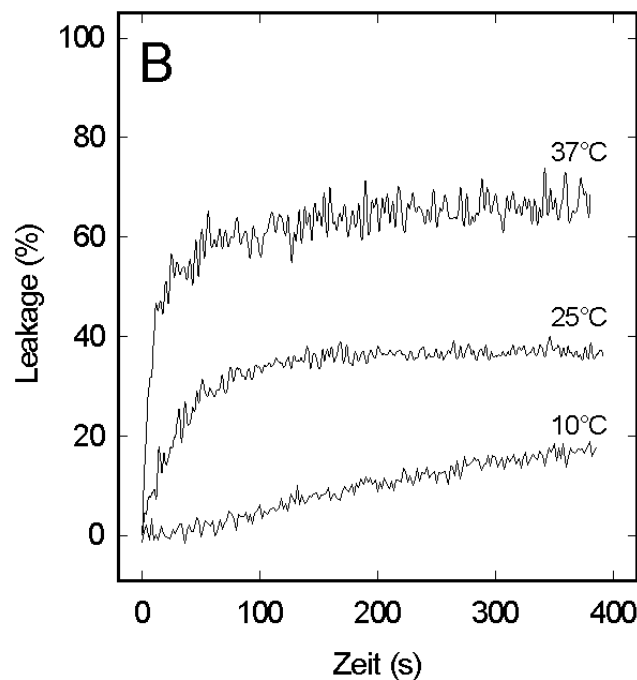


**Abbildung 4.6.** Das Ausmaß des Eisenipore-induzierten Leakage von SUV und LUV (eingefügtes Bild) verschiedener Lipidkompositionen als Funktion des L/P. , Lipidkomposition, die die äußere Membranschicht der Humanerythrozyten nachbildet: PC/Chol/SM/PE/GA (12:17:10:3:1); , PS/PC/Chol/SM (SUV); , PS/PC/Chol/SM (LUV); , PC/Chol/SM (1:1:2); , PC/SM (1:3). Der Leakage wurde mit dem ANTS/DPX Assay bei pH 7,4 und 25°C bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Details in *Material und Methoden*.



**Abbil**

**dung 4.7. pH- (A) und Temperatur- (B) (folgende Seite) Abhängigkeit der lytischen Aktivität von Eiseniapore.** Kinetiken des Leakages ANTS/DPX enthaltender SUV (PS/PC/Chol/SM, 1:1:2:4) wurden bei verschiedenen pH-Werten gemessen, 25 °C, (A) oder bei verschiedenen Temperaturen, pH 7,4. Für Details siehe Legende von Abbildung 4.3. und *Material und Methoden*. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung im Vergleich zu Abb. 4.3, 4.4 und 4.5.



**Abbildung 4.7 (B).** Das L/P betrug 250:1. Für Details siehe Legende von Abbildung 4.3. und *Material und Methoden*. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung im Vergleich zu Abb. 4.3, 4.4 und 4.5.

#### **4.2.2. Die ultrastrukturelle Analyse der Eisenipore-induzierten Membranläsion demonstriert die porenbildende Fähigkeit dieses Proteins**

Die Interaktion von Eisenipore mit Membranen kann mittels Elektronenmikroskopie, allerdings nur durch Verwendung von Glutaraldehyd-fixierten Proben, visualisiert werden. In der Gegenwart von Eisenipore konnten wir zirkuläre Strukturen im Lipidbilayer der Liposomen beobachten. Dies beschränkte sich jedoch auf die Liposomen, in denen Sphingomyelin in der Membran enthalten war (Abb. 4.8, A). Wir vermuten, daß diese Strukturen oligomere Komplexe von Eisenipore repräsentieren. Der Außendurchmesser der Pore lag bei ungefähr 10 nm, der Innendurchmesser betrug 3 nm. Die Seitenansicht zeigt eine quadratische Struktur des Komplexes mit einer Höhe von 10 nm, die vom Rand der Vesikelmembran herausragt. Somit formen Eiseniporekomplexe eine zylindrische Struktur mit einem zentralen Tunnel, welcher senkrecht zur Oberfläche der Vesikelmembran verläuft (Abb. 4.8, A: b-d). Ähnliche porenförmige Strukturen waren auch auf biologischen Membranen (Erythrozyten) zu beobachten (Abb. 4.8.B). Wegen ihrer hohen Sensitivität wurden wieder Schaferythrozyten verwandt (siehe auch Abb. 4.2). Nach der Inkubation mit Eisenipore zeigte die Erythrozytenmembran mehrere elektronen-

mikroskopisch sichtbare ringförmige Strukturen (Poren) mit einem Kanal im Zentrum. Wie bei den reinen Lipidmembranen der Liposomen ist auch hier zu vermuten, daß dieser Kanalkomplex aus oligomerisierten Eiseniaporemonomeren gebildet wird.

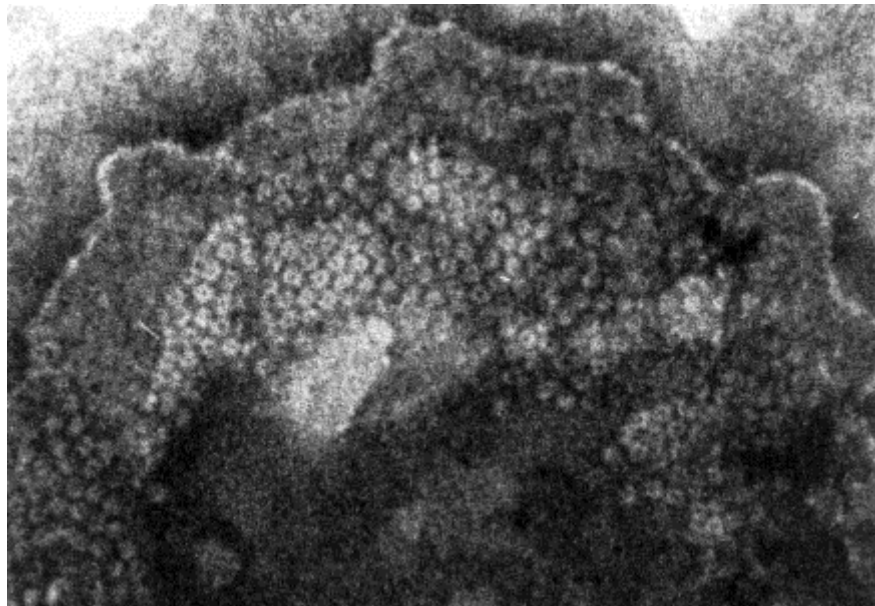


Abbildung 4.8. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ-gefärbten Erythrozyten in der Gegenwart von Eiseniapore. Die Erythrozyten wurden für 15 min bei 25 °C (L/P = 125:1) mit Glutaraldehyd fixiert, die anschließende Negativfärbung erfolgte mit Phosphorwolframsäure. Vergrößerung 400.000x.

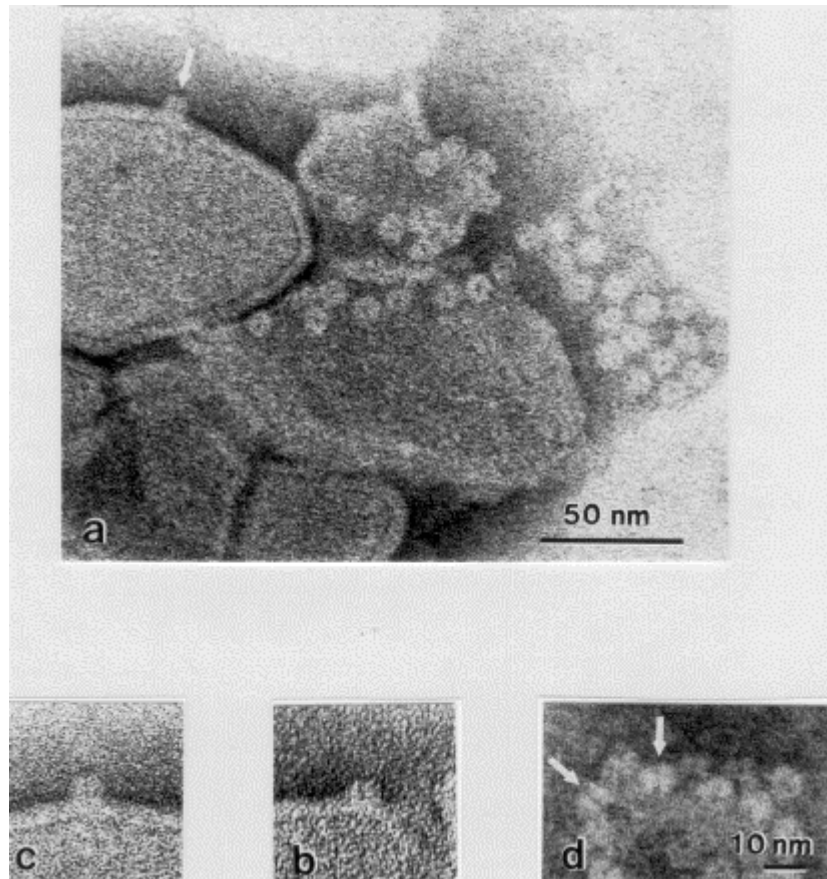


Abbildung 4.8. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ-gefärbten PC/SM/Chol-Liposomen in der Gegenwart von Eiseniapore. Die Liposomen wurden für 15 min bei 25 °C (L/P = 125:1) mit Glutaraldehyd fixiert, die anschließende Negativfärbung erfolgte mit Phosphorwolframsäure. Die *Pfeile* weisen auf die Seitenansichten des Eiseniapore-Komplexes hin. *a*, allgemeine Ansicht; *b-d*, ausgewählte Bilder der Seitenansicht von Eiseniapore. Vergrößerung 360.000 x (*a*) und 480.000 x (*b-d*).

Die Größenverhältnisse der Pore auf der Erythrozytenmembran liegen im Bereich der Komplexe, die auf den Membranen der Liposomen sichtbar gemacht werden konnten. Sie ähneln den transmembranalen Kanälen, wie sie durch den Membranangriffskomplex (MAC) des Komplementsystems oder durch das Staphylococcus  $\alpha$ -Toxin verursacht werden.

#### 4.2.3. Wie groß ist der effektive Durchmesser des Eiseniapore-Kanals in biologischen Membranen?

Der Durchmesser einer Proteinpore kann an Hand der elektronenmikroskopischen Abbildung vermessen werden. Dies sagt jedoch wenig über den Durchmesser aus, der von diffundierenden Molekülen effektiv genutzt werden kann. Wir haben deshalb den "effektiven Durchmesser" (Bhakdi et al., 1986<sup>24</sup>) bestimmt, indem dem Puffer unterschiedlich große osmotische Protektoren zugesetzt wurden (siehe *Material und Methoden*).

Bei diesem osmotischen Schutzassay werden die Erythrozyten in einem Puffer, der osmotische Protektoren enthält, suspendiert und anschließend im Hämolyse-Titrationsassay genutzt. Wenn der Durchmesser der Protektoren über 3 nm lag, (Dextran 4, Inulin, Polyethylenglykol (PEG)), nahm der Hämolysetiter ab.

Wenn die im Test verwandten Zellen mit dem Protektoren-enthaltenden Puffer gewaschen und anschließend in Protektoren-freiem Puffer resuspendiert wurden, war eine sofortige Lyse dieser Zellen nachweisbar. Daraus kann geschlossen werden, daß weder Inulin, Dextran oder PEG die Bindung von Eiseniapore an die Membran inhibieren, sondern, daß sie ausschließlich als osmotische Protektoren agieren. Außerdem bestätigen die Resultate die feste Bindung von Eiseniapore an die Membran, da die Komplexe nicht durch Waschen entfernt werden konnten. Niedermolekulare Zucker wie Sucrose und Raffinose haben keinen Einfluß auf den hämolytischen Titer von Eiseniapore (Tab. 4.7).

---

<sup>24</sup>In der zitierten Arbeit wurde erstmals diese Technik für die Bestimmung des effektiven oder funktionalen Durchmessers bei Porenbildnern des Komplementsystems angewandt (aktuellere Arbeiten: Mangel et al., 1995; Fehrenbach et al., 1996)

**Tabelle 4.7.** Inhibierung der Eiseniapore-vermittelten Hämolyse durch Protektoren (n=5)

| <b>Kohlenhydrate</b> | <b>Inhibierung der Hämolyse (%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------|
| Surcose              | 0                                   |
| Raffinose            | 0                                   |
| Inulin               | 87,5                                |
| Dextran 4            | 87,5                                |
| PEG 4000             | 93,75                               |

#### **4.2.4. Vergleichende Untersuchungen der Interaktion von Eiseniapore mit Erythrozyten, geschlossenen Ghosts und Nanoerythrocyten**

Eiseniapore induziert eine Hämolyse von Erythrozyten verschiedener Säuger (siehe Kapitel 4.2), wobei die lytische Sensitivität der Erythrozyten mit dem Anteil an Sphingomyelin (SM) in ihren Membranen korrelierte (Abb. 4.2). Weil Eiseniapore eine Lyse von Erythrozyten und Liposomen, die eine den Erythrozyten vergleichbare Lipidzusammensetzung besitzen, verursacht, bestimmten wir mit Hilfe der ANTS/DPX Freisetzung die Kinetik und das Ausmaß des Leakages von geschlossenen Ghosts.

Die Kinetik der Markerfreisetzung war bei geschlossenen Ghosts scheller und das Leakageausmaß höher als bei Liposomen, die in ihrer Lipidzusammensetzung den geschlossenen Ghosts ähnelten. Wir konnten bis zu dem niedrigen L/P von 16000:1 ein Leakage von 20% (nach 7 min) nachweisen. Ab einem L/P von 100:1 war der Leakage sehr hoch; bereits nach 1,5 min nach der Zugabe von Eiseniapore erreichte der Leakage 80% des Plateaus von 90% (Abb. 4.10.a).



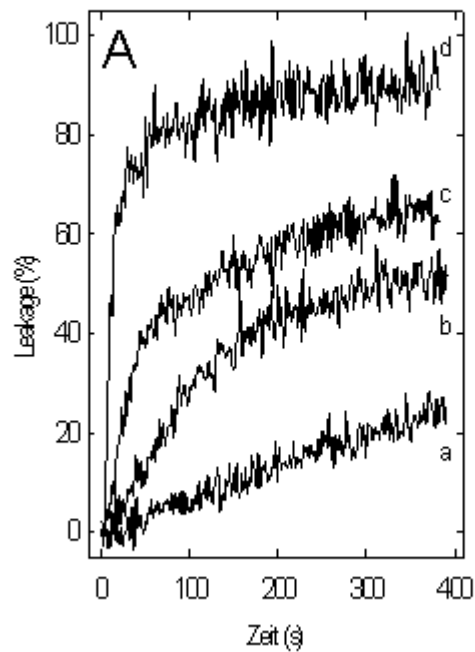


Abbildung 4.9. A, Eiseniapore-vermittelter Leakage von geschlossenen Ghosts (human) als Funktion des L/P. ANTS/DPX wurde in das Lumen der Ghosts eingeschlossen. Der Leakage wurde bei pH 7,4 und 25 °C gemessen. Die Lipidkonzentration der Ghost (10  $\mu$ M) wurde unter Annahme eines Protein zu Lipid Gewichtsverhältnis bei Erythrozytenmembranen von 1:1 bestimmt; die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry gemessen. L/P: a, 16000:1; b, 4000:1; c, 1000:1; d, 100:1. Details finden sich in *Material und Methoden*.

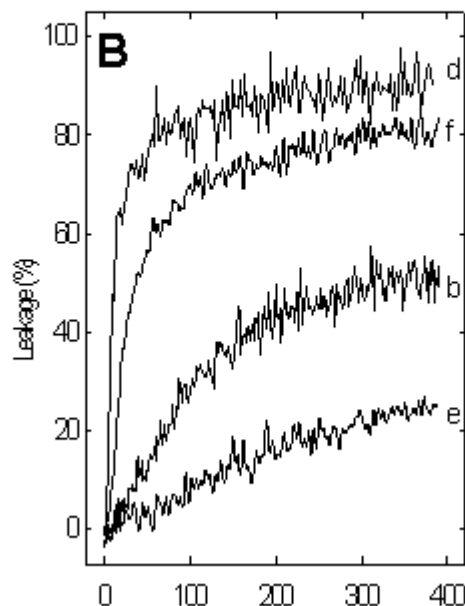


Abbildung 4.9. *B*, Einfluß von L- $\alpha$ -Lysopalmitoylphosphatidylcholin (C 16:0) auf die Leakage-aktivität von Eiseniapore. Geschlossene Ghosts wurden ohne (Kontrolle, *Kurve b* und *d*) oder mit 0.5 mol% Lysophosphatidylcholin (*Kurve e* und *f*) für 10 min bei 25 °C vorinkubiert. Die dann durchgeführte Messung der Eiseniapore-vermittelten Freisetzung von ANTS/DPX erfolgte bei verschiedenen L/P (pH 7,4, 25 °C): *b* und *e*, 4000:1; *d* und *f*, 100:1. Details finden sich in *Material und Methoden*.

In erster Näherung ist das Verhältnis von Halbwertszeit des Eiseniapore-induzierten Leakage zur inversen Eiseniaporekonzentration als lineare Funktion darstellbar (Abb. 4.5.b). Um zu bestimmen, ob auch die Zusammensetzung der Lipidphase der geschlossenen Ghosts eine kritische Größe der Interaktion mit Eiseniapore darstellt, wurden geschlossene Ghosts mit 0,5 mol% Lyso-phosphatidylcholin (C16:0) vorinkubiert. Der spontane Einbau dieser Lipide in die Membran der geschlossenen Ghosts wurde in unserer Arbeitsgruppe mit radioaktiv gelabeltem Lyso-phosphatidylcholin gezeigt<sup>25</sup>. Geschlossene Ghosts, in die Lyso-phosphatidylcholin eingebaut wurde, zeigten einen deutlich niedrigeren Leakage (Abb. 4.10.b).

Ähnlich wie bei Liposomen wurde kein Leakage nach Denaturierung von Eiseniapore (30 min, 56 °C) beobachtet.

Das hohe Ausmaß des Leakage der geschlossenen Ghosts ließ folgende Vermutungen zu:

<sup>25</sup>B. Baljinnyam, B. Schroth-Diez, A. Herrmann, unpublizierte Ergebnisse

- (i) ein Rezeptor auf der Erythrozytenmembran vermittelt die Wechselwirkung mit Eiseniapore,
- (ii) die Größe der Targetzellen ist eine determinierende Größe des Leakage oder (iii) die geschlossenen Ghost haben eine labilere Membranintegrität, die zu einer größeren Empfindlichkeit gegenüber Eiseniapore führt.

Um die Ursache abzuklären, verglichen wir das Ausmaß des Leakage von LUV (reine Lipidmembran) mit dem Leakage von Nanoerythrocyten (biologische Membran). Letztere sind geschlossene Ghost, die so behandelt wurden, daß sie den gleichen Durchmesser wie LUV besitzen (siehe *Material und Methoden*). Die LUV bildeten in ihrer Lipidkomposition die exoplasmatische Lipidmembran der Erythrozyten (PC/Chol/SM/PE/GA (12:17:10:3:1)) nach (siehe oben). Bei der ANTS/DPX Freisetzung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Nanoerythrocyten und den LUV beobachtet (Abb. 4.11.). Deshalb kann die Existenz eines spezifischen Rezeptors für Eiseniapore auf der Erythrozytenmembran ausgeschlossen werden.

Da die Membrankrümmung, wie oben gezeigt, die Markerfreisetzung nicht determiniert, kann angenommen werden, daß eine labilere Membranintegrität der geschlossenen Ghost die Ursache für die beobachteten Unterschiede ist.

#### **4.2.5. Eiseniapore bindet im Gegensatz zu lytischen Peptiden an der Liposomen-membran irreversibel**

Da der Leakage der Vesikel in einigen Versuchen auch nach 90 min noch kein endgültiges Plateau erreicht hatte, kann ein Wechsel Eiseniapore von einem bereits lysierten Vesikel zu einem noch nicht angegriffenen angenommen werden (S. Nir, persönliche Mitteilung)<sup>26</sup>.

Um festzustellen, ob die Bindung an Sphingomyelin-haltige Membranen reversibel ist, bestimmten wir den ANTS/DPX Leakage von Liposomen nach der Vorinkubation von Eiseniapore mit ungelabelten Vesikeln. Wurde Eiseniapore mit Sphingomyelin-freien Vesikeln (PC, PC/Chol (1:1) oder PC/PS (1:1)) für 15 min bei 25°C vorinkubiert und anschließend mit gelabelten PC/Chol/SM-Vesikeln (1:1:2) inkubiert, erfolgte eine ANTS/DPX Freisetzung, die in Ausmaß und Kinetik ähnlich der Kontrolle - einer Vorinkubation ohne Liposomen - war.

---

<sup>26</sup> Ein solches Verhalten konnte für viele lytische Peptide gezeigt werden (siehe auch: Nicol et al., 1996).

Die Vorinkubation mit PC/Chol/SM Liposomen gefolgt von einer Zugabe ANTS/DPX-gelabelter Vesikel gleicher Zusammensetzung zeigte keine Lyse. Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß Eiseniapore irreversibel an Sphingomyelin-haltigen Liposomen bindet (Abb. 4.12.), sowie, daß Cholesterol die Membranbindung von Eiseniapore nicht vermitteln kann.

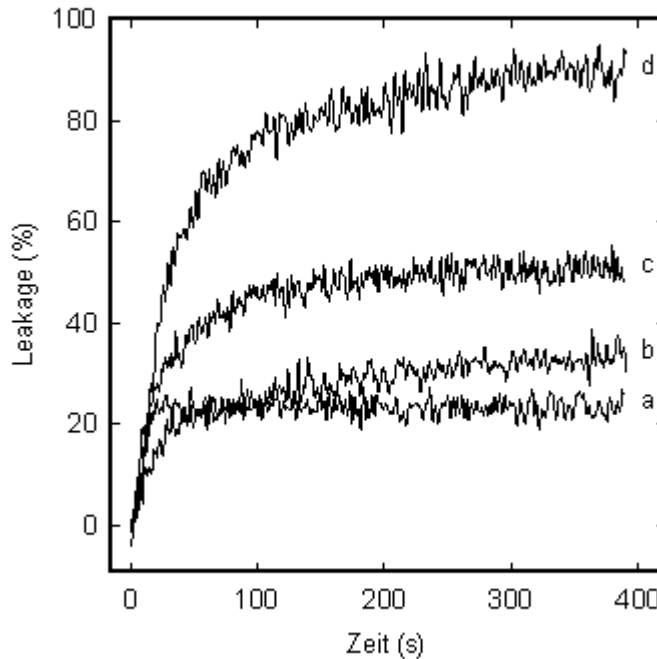


Abbildung 4.10. Der Eiseniapore-vermittelte Leakage an unterschiedlichen liposomalen Targets: aus humanen Ghosts hergestellte Nanoerythrocyten; 100 nm (Kurve a), große unilamellare Vesikel (LUV), 100 nm (Kurve b); kleine unilamellare Vesikel (SUV), 40 nm (Kurve c). Die Lipidzusammensetzungen der LUV und SUV ist der des äußeren Monolayers von humanen Erythrozyten ähnlich (Ei-PC/Chol/SM/PE/GA (12:17:10:3:1)) und geschlossene Ghosts (Kurve d). Das molare Lipid/Protein Verhältnis betrug 250:1 (mol/mol), bei einer Eiseniaporekonzentration von 40 nM (Endkonzentration). Details, insbesondere zur Herstellung der Nanoerythrocyten: *Material und Methoden*)

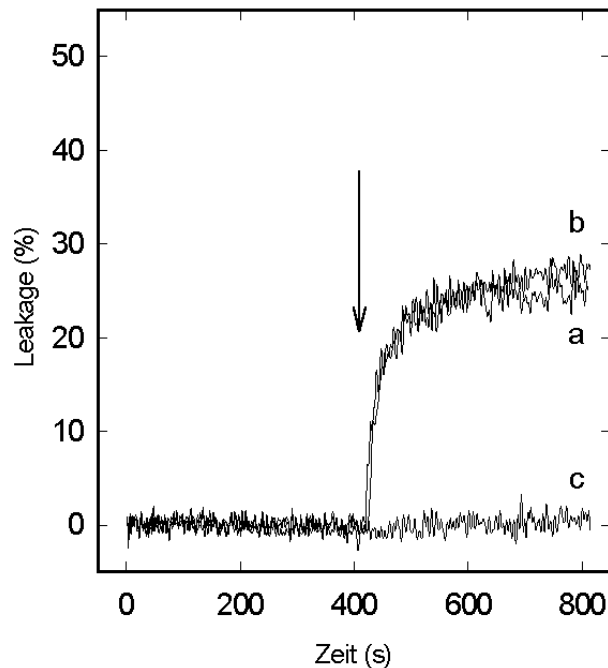
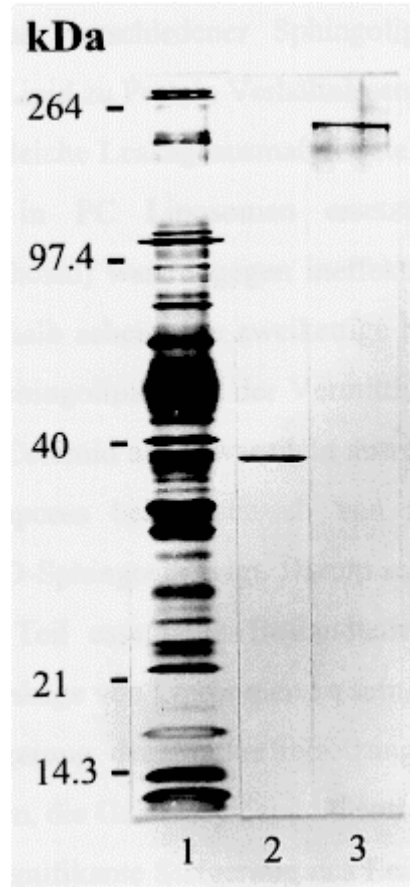


Abbildung 4.11. Die Vorinkubation von Eiseniapore mit Liposomen verschiedener Zusammensetzung beeinflusst die ANTS/DPX Freisetzung von PC/Chol/SM-Liposomen, die nach 420 Sekunden (Pfeil) zugegeben wurden. Wenn die Vorinkubation von Eiseniapore in der Abwesenheit von Liposomen erfolgte, konnte ein signifikanter Leakage beobachtet werden (*Kurve a*). Ein der Kontrolle ähnlicher Leakage wurde bei der Vorinkubation von Eiseniapore mit ungelabelten PC/Chol (1:1) Liposomen gemessen (*Kurve b*). Kein Leakage wurde beobachtet, wenn Eiseniapore mit ungelabelten PC/Chol/SM-Liposomen (1:1:2) vorinkubiert wurde (*Kurve c*). Die ungelabelten Liposomen (SUV) wurden bei  $t = 30$  s zugegeben. Während der Inkubation von Eiseniapore mit den Liposomen betrug das L/P 125:1. Nach der Zugabe von gelabelten Liposomen war es in allen Fällen L/P 250:1. Die Messungen wurden bei pH 7,4 und 25 °C durchgeführt. Details finden sich in *Material und Methoden*.

Die Daten der SDS-PAGE können ebenfalls in die Richtung einer irreversiblen Bindung über einen SDS-resistenten Komplex interpretiert werden (Abb. 4.13.). Die irreversible Bindung des Proteins an die Membran könnte mit der Bildung eines hochmolekularen, SDS-resistenten Komplexes von Eiseniapore erklärt werden, der erst nach 30 minütigem Kochen zerstört werden kann. Der hochmolekulare Komplex hat das Gewicht von ungefähr 228 kDa und ist somit sechsmal schwerer als das Monomer (38 kDa); somit könnte sich ein Hexamer gebildet haben.

Abbildung 4.12. Die Bildung eines stabilen Oligomers Eiseniapores in PC/Chol/SM (1:1:2) Liposomen. Die Inkubation der Eiseniapore-Vesikel Suspension erfolgte bei pH 7,4, 25 °C. Das



L/P betrug 250:1. Der anschließenden Analyse mit der SDS-PAGE (5-10%) folgte eine Silberfärbung. *Bande 1*, vollständige Cölomflüssigkeit (25 µg); *Bande 2*, Eiseniapore (2.1 µg); *Bande 3*, Eiseniapore nach Vorinkubation von PC/Chol/SM Liposomen (1.4 µg).

#### 4.2.6. Welche molekularen Komponenten Sphingomyelins sind für den Leakage essentiell?

Durch die folgenden Experimente wurde aufgeklärt, welche strukturellen Merkmale Sphingomyelins für die Interaktion von Eiseniapore mit der Lipidmembran wichtig sind. Außerdem untersuchten wir, ob die Cholesterol-Sphingomyelin-Komplexe für die Erhöhung des Leakages beim Einbau von Cholesterol in Sphingomyelin-haltige Liposomen verantwortlich sind. Dazu wurde das Ausmaß des Leakages in der Gegenwart verschiedener Sphingolipide sowie bei mehreren Temperaturen und molaren Lipid zu Protein Verhältnissen bestimmt.

Es war nahezu das gleiche Leakageausmaß feststellbar, wenn Sphingomyelin durch Galaktosylceramid in PC Liposomen ersetzt wurde. Das einkettige Galaktosylsphingosin (Psychosin) war hingegen ineffektiv für die Vermittlung des Leakages (Tabelle 4.7). Deshalb scheint die zweikettige Struktur des Ceramids eine wesentliche Struktur der Sphingolipide bei der Vermittlung eines Leakage zu sein. Aber auch die Präsenz von Ceramid allein war nicht ausreichend, wie das Fehlen der lytischen Aktivität Eiseniapore bei Austausch von Sphingomyelin durch das doppelkettige N-Palmitoyl-D-Sphingosin zeigt. Darum scheinen die Ceramidstruktur wie auch der hydrophile Teil essentielle Bestandteile der Membran für einen Eiseniapore-vermittelten Leakage von Liposomen zu sein.

Keine weitere Steigerung der Markerfreisetzung wurde beobachtet, wenn Cholesterol in PC Liposomen, die Galaktosylceramid enthielten, eingebaut wurde. Im Gegensatz dazu war eine signifikante Steigerung des Leakage von PC Vesikeln, die Sphingomyelin enthielten, nach Einbau von Cholesterol bestimmbar (Tabelle 4.8). Diese Daten weisen auf eine Interaktion zwischen Cholesterol und Sphingomyelin, z.B. über die Bildung von Komplexen (siehe *Diskussion*), hin, die für die Steigerung der lytischen Aktivität von Eiseniapore verantwortlich sind. Für die untersuchten Liposomen maßen wir den Ordnungsparameter des ESR Membranspektrums von spinngelabelten Fettsäuren I (12,3) bei 37 °C und pH 7,4 (Tabelle 4.7, Spektren nicht gezeigt).

**Tabelle 4.8. Der Eiseniapore-vermittelter Leakage und Membranfluidität von Liposomen mit verschiedenen Sphingolipiden (10 mol%), L/P 250:1.** Das Leakageausmaß wurde 5 min nach der Zugabe Eiseniapores zu den Liposomen bestimmt. Die Konzentration des Fettsäureanalogons betrug 1 mol% der Lipidkonzentration. Die Spektren wurden in Abwesenheit Eiseniapores aufgenommen.

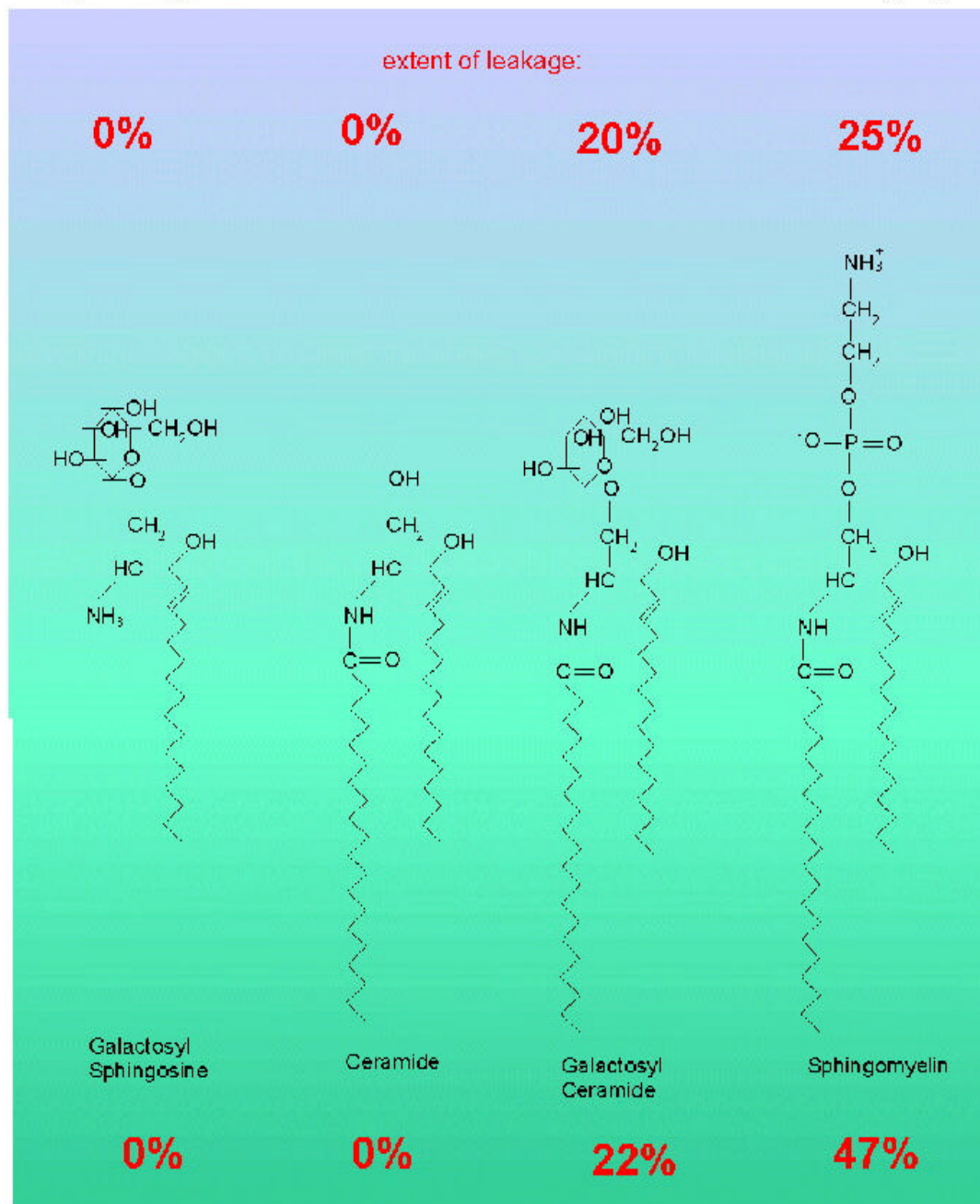
| Lipidzusammensetzung  | Leakage-<br>ausmaß<br>(%) | Ordnungs-<br>parameter |
|---|---------------------------|------------------------|
| Phosphatidylcholin : Cholesterol : Sphingomyelin<br>(9 : 9 : 2)                     | 47                        | 0.709                  |
| Phosphatidylcholin : Sphingomyelin<br>(9 : 1)                                       | 25                        | 0.630                  |
| Phosphatidylcholin : Cholesterol : Galaktosylceramid <sup>a</sup><br>(9 : 9 : 2)    | 22                        | 0.714                  |
| Phosphatidylcholin : Galaktosylceramid <sup>a</sup><br>(9 : 1)                      | 20                        | 0.632                  |
| Phosphatidylcholin : Cholesterol : Ceramid <sup>b</sup><br>(9 : 9 : 2)              | 0                         | 0.715                  |
| Phosphatidylcholin : Ceramid <sup>b</sup><br>(9 : 1)                                | 0                         | 0.629                  |
| Phosphatidylcholin : Cholesterol : Galaktosylsphingosin <sup>c</sup><br>(9 : 9 : 2) | 0                         | 0.694                  |
| Phosphatidylcholin : Galaktosylsphingosin <sup>c</sup><br>(9 : 1)                   | 0                         | 0.627                  |

<sup>a</sup>Typ I; 98% -Hydroxy-Fettsäure, <sup>b</sup>N-Palmitoyl-D-Sphingosin, <sup>c</sup>1-β-D-Galaktosyl-Sphingosin (Psychosin) Die umseitige Abb. 4.13. gibt die Resultate der Tabelle 4.8. in Verbindung mit den Formeln der Sphingolipide wieder. **Oberhalb** der Formeln erscheinen die Leakagewerte (rot), für die Versuche, in denen die Sphingolipide in **PC**-Vesikel eingebaut waren; **untenhalb**: mit den in **PC/Chol**-Vesikel eingebauten Sphingolipiden.



## Phosphatidylcholin

-vesicles + 10 mol% different shingolipids:



**Phosphatidylcholine/Cholesterol**-vesicles + 10 mol% different shingolipids:

Abbildung 4.13. Erläuterungen auf Seite 69.

Dieser Parameter charakterisiert die Membranfluidität. Es wird deutlich, daß die Membranfluidität nicht mit dem Leakage korreliert, daher sind die in Tabelle 4.8 dargestellten Unterschiede des Leakageausmaßes nicht auf eine veränderte Membranfluidität der Liposomen zurückzuführen. Somit kann in Übereinstimmung mit obigen Resultaten (Kap. 4.2.1) gefolgert werden, daß die Membranfluidität keine essentielle Determinante der lytischen Aktivität Eiseniaporens ist.

#### 4.2.7. Die Struktur von membranassoziiertem Eiseniapore

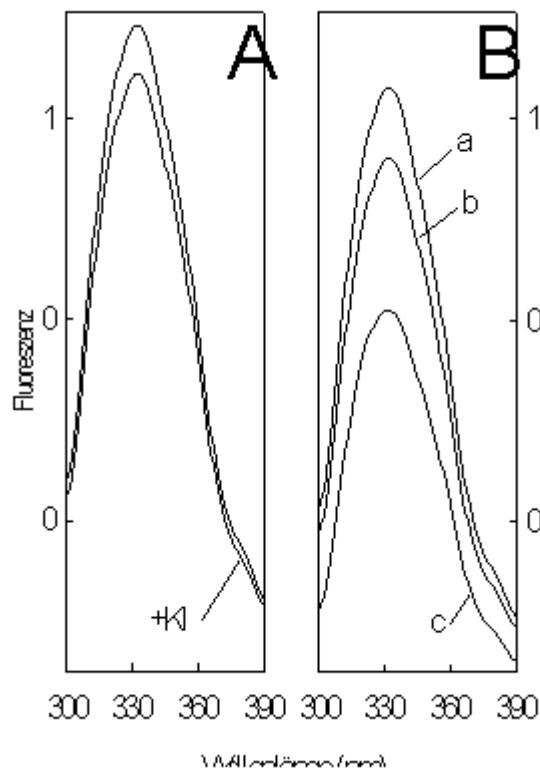
Das Fluoreszenzspektrum der Tryptophangruppen wurde durch Anregung Eiseniapores bei 286 nm untersucht (Abb. 4.13). Möglicherweise sind die Tryptophangruppen im ungebundenen Eiseniapore in einer hydrophoben Region eingesenkt. Diese Überlegung wird durch das Fluoreszenzmaximum von 333 nm unterstützt, das für eine apolare Umgebung charakteristisch ist.

In Gegenwart des polaren, wäßrigen Quenchers Kaliumiodid<sup>27</sup> (Endkonzentration 20 mM), der vornehmlich mit Tryptophangruppen in polarer Umgebung wechselwirkt, ist eine Verminderung der Fluoreszenz von circa 8 % meßbar. Es tritt jedoch keine Veränderung der Fluoreszenz, sowohl der Intensität als auch der Lage, in Gegenwart der Liposomen ein, die kein Sphingomyelin enthalten.

Hingegen war ein deutlicher Abfall der Fluoreszenz bei Zugabe von PC/Chol/SM Liposomen zu beobachten (Abb. 4.13.b). Das Wellenlängenmaximum verschob sich dann nur geringfügig zu 335 nm. Nach der Membranbindung von Eiseniapore erfolgte eine größere Fluoreszenzunterdrückung durch Kaliumiodid; die Fluoreszenzintensität nahm in Anwesenheit von Kaliumiodid im Vergleich zur Kontrolle um 30% ab.

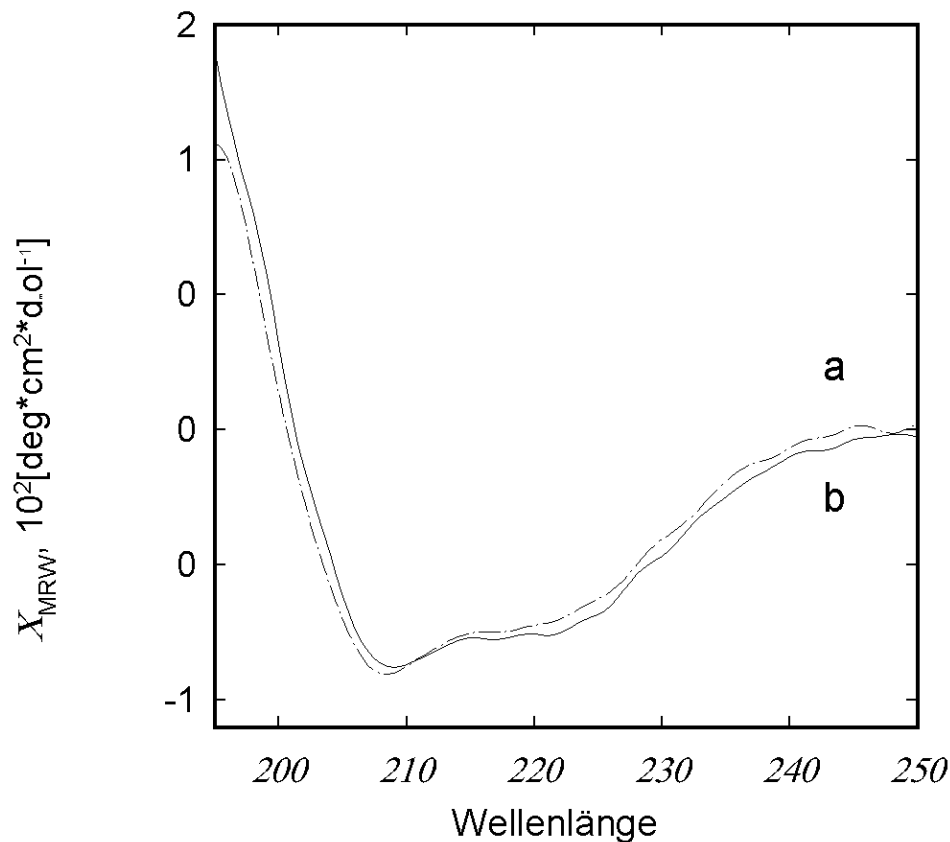
---

<sup>27</sup>ältere Nomenklatur Kaliumjodid



**Abbildung 4.14. Tryptophanfluoreszenz von (A) Eiseniapore (Endkonzentration 40 nM) und (B) in der Gegenwart verschiedener Konzentrationen von PC/Chol/SM-SUV.** A, das Spektrum von Eiseniapore wurde in Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Gegenwart von 20 mM KI gemessen. B, das Spektrum von Eiseniapore wurde in der Gegenwart von PC/Chol/SM Liposomen in PBS gemessen, L/P = 125:1 (a) und L/P = 250:1 (b und c). Kurve c wurde in der Gegenwart von 20 mM KI bestimmt. Die Messungen wurden bei pH 7,4 und 25 °C durchgeführt; Anregungswellenlänge:  $\lambda_{\text{ex}} = 286 \text{ nm}$ . Details finden sich in *Material und Methoden*.

Das CD-Spektrum von Eiseniapore wurde in Ab- und Anwesenheit von Liposomen bestimmt. Hierbei wurden sowohl Sphingomyelin-haltige als auch reine PC-Vesikel verwandt. Es konnte keine Veränderung des CD-Spektrums nach Zugabe von Vesikeln mit und ohne Sphingomyelin beobachtet werden (Abb. 4.14). Die Sekundärstruktur von Eiseniapore besaß folgende Zusammensetzung: 37%  $\beta$ -sheet, 28%  $\alpha$ -helix, 17%  $\beta$ -turn und 18% Zufallsknäuel.



**Abbildung 4.15. Circular dichroismus-(CD) Spektren von Eiseniapore in Abwesenheit (a) und Anwesenheit (b) von PC/Chol/SM SUV (L/P = 250:1).** Die Proteinkonzentration betrug 2  $\mu\text{M}$  in PBS-Puffer, pH 7,4. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Daten sind in mittleren Restelliptizitäten, basierend auf einer mittleren Aminosäurerestmasse von 105, dargestellt.

### 4. 3. Die Regulation der lytischen Aktivität

#### 4.3.1. Isolation und Charakterisierung eines Eiseniapore-regulierenden Faktors (ERF) aus der Cölomflüssigkeit von Anneliden

Das Ausgangsmaterial der Proteinfractionierung war eine gepoolte Cölomflüssigkeit aus 100 Anneliden der Unterart *E. f. fetida*. Nach Zentrifugation (15.000 x g, 10 min) wurde die Cölomflüssigkeit von zellulären Bestandteilen getrennt. Der so gewonnene Überstand (1.13 ml) mit einem Proteingehalt von 6.9 mg/ml wurde auf das Sammelgel der Prep-Cell Apparatur (Bio-Rad, USA) gegeben.

Der Fluß des Elutionspuffers startete, als die gefärbte Proteinbande den Boden der Gelsäule

erreichte. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt. Tabelle 4.9 zeigt die 260-fache Aufreinigung des Eiseniapore-regulierenden Faktors (ERF). Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Reagenzien mit einem Wert von 0.0235 mg/ml bestimmt.

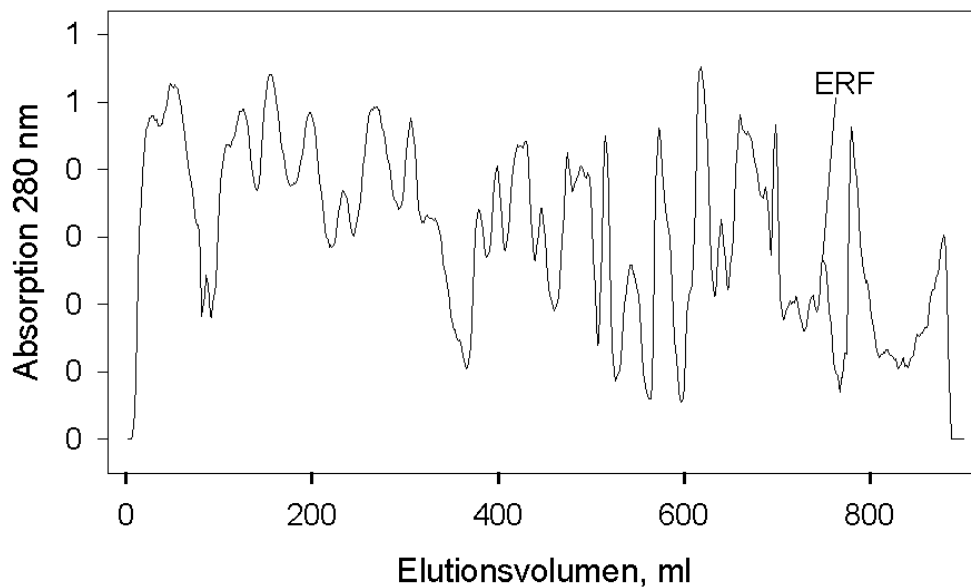
**Tabelle 4.9.** Ein-Schritt Reinigung des ERF

| Material             | Protein<br>(total)<br>mg | Aktivität<br>u/ml | Aktivität<br>(total) | spezifische<br>Aktivität<br>u/mg | Ausbeute<br>% | Reinigungs-<br>faktor |
|----------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|----------------------------------|---------------|-----------------------|
| Cölm-<br>flüssigkeit | 7,8                      | 48                | 72                   | 9,2                              | 100           | 1                     |
| ERF                  | 0,024                    | 12                | 56                   | 2400                             | 78            | 259                   |

*Nachweis der inhibitorischen Aktivität:* Die Wirkung des Eiseniapore-regulierenden Proteins (ERF) wurde im Titrations-Assay nachgewiesen. Eiseniapore induziert im Elutionspuffer (siehe *Material und Methoden*) einen Titer von 1:6144, dieser fällt in Gegenwart des ERF (Endkonzentration 15 nM) um 93,75% auf den Titer von 1:384 (Tabelle 4.10.). Die Reinheit des ERF wurde durch Silberfärbung des SDS-Gels nachgewiesen (Abb. 4.17).

**Tabelle 4.10.** Inhibition der durch Eiseniapore vermittelten Hämolyse durch den Eiseniapore-regulierenden Faktor aus der Cölmflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida*

| hämolytisches System | Titerstufe der Hämolyse |
|----------------------|-------------------------|
| Eiseniapore          | 1:6144                  |
| Eiseniapore + ERF    | 1:384                   |



**Abbildung 4.16. Elutionsprofil der kontinuierlichen Elutions-Elektrophorese.** Der Elutions-Puffer enthielt reduzierende Agentien, um die Aktivität des ERF zu schützen. Probe: 7,8 mg Proteinsuspension aus der Cöloflüssigkeit. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Der Vergleich der Elutionsprofile von Eiseniapore- und ERF-Reinigung demonstriert die unterschiedliche Gelzusammensetzung der Säulen sowie das voneinander abweichende Säulenvolumen.

Das Regulatorprotein (ERF) ist bei Raumtemperatur sehr instabil, die Hälfte seiner inhibierenden Aktivität verliert es bereits nach ungefähr 12 Stunden. Die Substanzen und Ionen, die nach dem Protokoll der Proteincharakterisierung von Suelter (1990) zu verwenden sind, beeinflussen bereits zum größten Teil die Aktivität von Eiseniapore (siehe "*Charakterisierung von Eiseniapore*"), so daß eine isolierte Charakterisierung von ERF kaum möglich war. Außerdem fiel die Aktivität des ERF in den Kontrollen bei 37 °C so drastisch ab, daß keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Dieser Aktivitätsverlust war im Gegensatz zu Eiseniapore nicht durch Glycerol zu kompensieren.

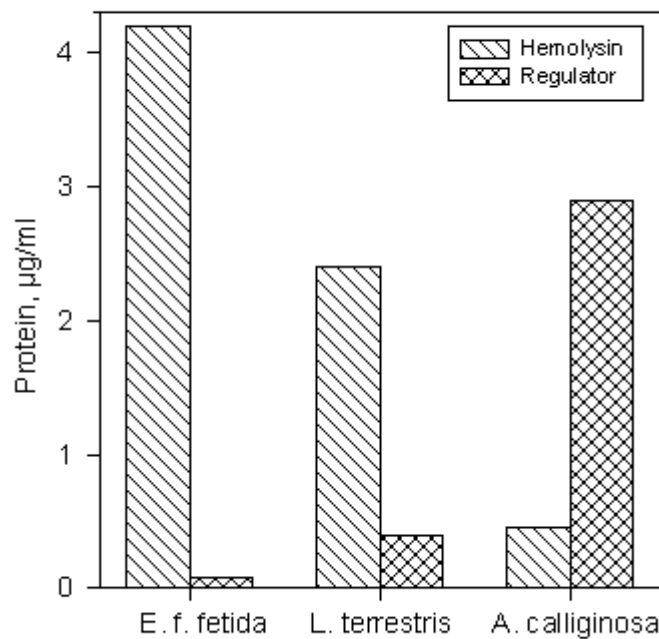
#### 4.3.2. Die Reinigung dem ERF funktional ähnlicher Proteine aus der Cölo- flüssigkeit verschiedener europäischer Lumbriciden

Ausgehend von der postulierten Ähnlichkeit (siehe *Diskussion*) des Anneliden-Inhibitors aus der Cöloflüssigkeit und Vitronectins aus Säugerseren, wurde die Cöloflüssigkeit analog dem Serum behandelt, aus dem Vitronectin isoliert werden soll. Nach dem Verfahren von Nakashima et al. (1992) wurde die Cöloflüssigkeit der Anneliden *Eisenia fetida* ssp., *L. terrestris* und *A. caliginosa* mit einer Heparin-Säule fraktioniert, anschließend über Nacht im Kühlschrank

dialysiert und im Test verwandt.

Die Fraktionen wurden auf ihre inhibierende Wirkung der lytischen Aktivität von Eiseniapore getestet. Aus allen untersuchten Arten konnten Fraktionen mit inhibierender Wirkung isoliert werden. Mit dieser ursprünglich für die Reinigung des multifunktionellen Proteins Vitronectin ausgearbeiteten Trennmethode können jedoch nicht alle Begleitproteine vollständig entfernt werden, es ist aber im Gegensatz zur Elutionselektrophorese mit dieser säulenchromatographischen Trennung eine Konzentrierung des zu isolierenden Proteins möglich.

Es konnte im Vergleich der unterschiedlichen Anneliden gezeigt werden, daß *A. caliginosa* die höchste Konzentration des Inhibitors besitzt, während *E. f. fetida* hat von den drei untersuchten Arten den geringsten Anteil des Regulators hat (Abb. 4.16). Allerdings sind die Inhibitorkonzentrationen sehr starken saisonalen Effekten unterworfen.



**Abbildung 4.17. Die Oligochaeten (Anneliden) besitzen einen unterschiedlichen Anteil an lytischen und regulierenden Proteinen.** Die Konzentrationsangaben (µg/ml) beziehen sich auf die Proteinmengen, die aus einem Milliliter Cölomflüssigkeit gereinigt werden konnten (Details in *Material und Methoden*). Eiseniapore, das Hämolysin aus *E. f. fetida*: 4,2 µg/ml, Hämolysin aus *L. terrestris* (2,4 µg/ml) und *A. caliginosa* (0,46 µg/ml). Die Regulator-Proteine: ERF (0,08 µg/ml), aus *L. terrestris* (0,4 µg/ml) und *A. caliginosa* (2,9 µg/ml).

#### 4.3.3. Präparation Vitronectins/S-Proteins und der Nachweis der funktionalen Integrität

Vitronectin wurde nach zitierter Methode (Kap. 4.3.2) isoliert und dialysiert. Um die funktionelle Integrität des von uns isolierten Vitronectins/S-Proteins (Endkonzentration 15 nM) auszuweisen, untersuchten wir den Einfluß auf die Komplement-vermittelte Hämolyse. Die durch Komplement induzierte Hämolyse wurde durch das isolierte Vitronectin/S-Protein beeinflusst. In dessen Gegenwart wird die Komplementlyse um 4 Titerstufen - das heißt um 93.75% - unterdrückt (Tab. 4.12.).

**Tabelle 4.12.** Inhibition der durch Komplement vermittelten Hämolyse durch Vitronectin (n=7)

| hämolytisches System                  | Titerstufe der Hämolyse |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Komplement                            | 1:256                   |
| Komplement +<br>Vitronectin/S-Protein | 1:16                    |

#### 4.3.4. Die Hämolyse-Regulatoren aus dem Säuger und den Oligochaeten sind funktionell austauschbar

Das gewonnene Material aus Säugerserum (Vitronectin) und der Cölomflüssigkeit (Anneliden-Inhibitor) wurde in seiner inhibierenden Wirkung im jeweils anderen System getestet (siehe *Material und Methoden*). Es zeigte sich, daß der Invertebraten-Regulator (Endkonzentration jeweils 15 nM) in der Lage ist, die Komplement-vermittelte Hämolyse zu unterdrücken (Tab. 4.13). Die inhibitorische Wirkung von *Lumbricus terrestris*- und *Eisenia fetida fetida*-Inhibitor ist identisch.



**Tabelle 4.13.** Inhibition der durch Komplement vermittelten Hämolyse durch Regulatoren aus Anneliden (n=9)

| <b>hämolytisches System</b>                              | <b>Titerstufe der Hämolyse</b> |
|--|--------------------------------|
| Komplement   | 1:256                          |
| Komplement +<br>Regulator aus <i>E. f. fetida</i> (=ERF) | 1:32                           |
| Komplement +<br>Regulator aus <i>L. terrestris</i>       | 1:32                           |

Der Inhibitor der terminalen Komplementkomponenten, das Vitronectin, inhibiert die Eiseniapore-vermittelte Hämolyse um 87.5%. Wenn Vitronectin durch dekomplementiertes Serum ausgetauscht wurde, verstärkte sich die inhibierende Wirkung um 93.75%, was auf zusätzliche inhibierende Substanzen hindeutet.<sup>28</sup>

<sup>28</sup> Vergleiche dazu auch: Eue (1991), Dissertation; S. 95 ff, Die Wirkung von high density lipoproteins (HDL) auf die hämolytische Aktivität der *Eisenia foetida* Cölomflüssigkeit und Tschopp et al. (1986) über die Wirkung von HDL auf die Aktivität von poly-C9 und Perforin.

**Tabelle 4.14.** Einfluß von Serum/Vitronectin auf die Eiseniapore-vermittelte Hämolyse (n=7)

| <b>hämolytisches System</b>            | <b>Titerstufen der Hämolyse</b> |
|--|---------------------------------|
| Eiseniapore                            | 1:6144                          |
| Eiseniapore + Vitronectin              | 1:768                           |
| Eiseniapore + dekomplementiertes Serum | 1:384                           |

#### **4.3.5. Heparin beeinflusst die inhibitorische Aktivität des Eiseniapore-regulierenden Faktors**

Für Vitronectin wurde ein basischer Heparin-Bindungsort beschrieben (Preissner et al., 1989), der sich an die cysteinreiche Domäne der Komplementkomponente C9 anlagert und dadurch die Oligomerisierung und die folgende Bildung einer Proteinpore verhindert. Wenn der Heparin-Bindungsort mit Heparin maskiert wird, kann dieser nicht mehr mit den Proteinmonomeren interagieren und verliert so seine inhibierende Aktivität. Auf Grund der Funktionsgleichheit von Vitronectin und dem ERF haben wir untersucht, ob Heparin die inhibierende Wirkung des ERF beeinflusst.

105 Internationale Einheiten (I.E.) Heparin/ml<sup>29</sup> im Ansatz wurden im Puffer vorgelegt, dann 30 min bei 37 °C mit Eiseniapore und dem ERF inkubiert und anschließend Targetzellen (2% Erythrozyten vom Schaf in PBS-Puffer) zugegeben. Sowohl die inhibitorische Wirkung von Vitronectin (Kontrolle), als auch die des ERF läßt sich durch Heparin einschränken (Tab. 4.15).

---

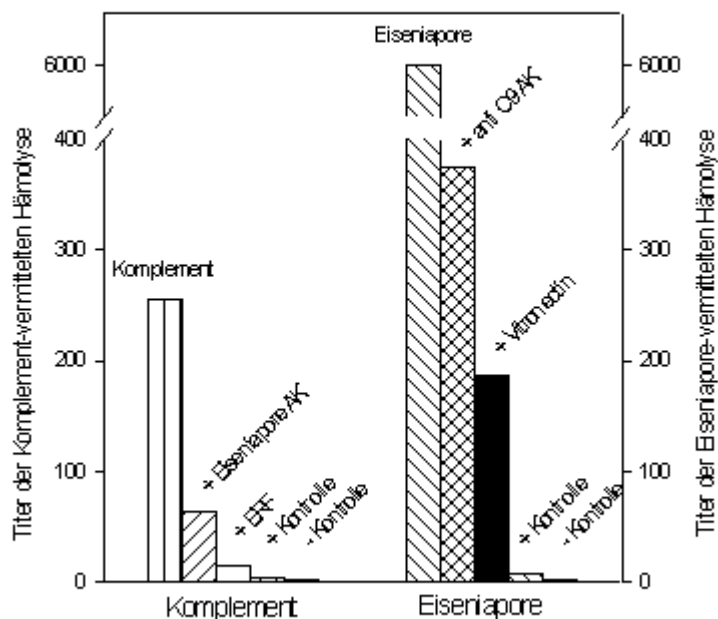
<sup>29</sup>105 I.E./ml Heparin hemmen die hämolytische Aktivität von Komplement und Eiseniapore nicht.

**Tabelle 4.15:** Einfluß von Heparin auf die inhibierende Wirkung von Vitronectin und ERF (n=5)

| <b>hämolytisches System</b>           | <b>inhibitorische Aktivität des Regulatorproteins (%)</b> |
|---------------------------------------|---|
| Eiseniapore + Vitronectin             | 86  |
| Eiseniapore + Vitronectin und Heparin | 29  |
| Eiseniapore + ERF                     | 87.5  |
| Eiseniapore + ERF und Heparin         | 25  |

#### **4.3.6. Eiseniapore/ERF und Komplement/Vitronectin sind analoge Proteingruppen - lytische Aktivitäten in der Anwesenheit der Regulatorproteine und Antikörper**

Die natürlichen Inhibitoren/Regulatoren der lytischen Proteine, beim Komplement das Vitronectin und bei Eiseniapore der Eiseniapore-regulierende Faktor (ERF), zeigen in dem gewählten Titrationsassay eine deutlich inhibitorische Aktivität auf die hämolytische Aktivität (Tab. 4.10 und 4.12). Da eine immunologische und funktionale Verwandtschaft von Vitronectin und ERF gezeigt werden konnte, untersuchten wir, ob sich diese auch in einer funktionalen Wirkung der jeweiligen Antikörper niederschlägt. Nach dem kreuzreagierendes Verhalten von anti-C9 Antiserum und Eiseniapore nachgewiesen werden konnte, wurde der funktionalen Einfluß dieser Antikörper untersucht (Abb. 4.18). Dazu wurden Antikörper, die gegen humanes C9 gerichtet sind, in einer Verdünnung von 1:500 und 1:10 in PBS vorgelegt, das in diesem Puffer titrierte Eiseniapore wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Der anschließend bestimmte Hämolysetiter Eiseniapores fällt in Gegenwart von anti-C9 Antiserum in einer 1:500 Verdünnung um 50%. In einer Verdünnung von 1:10 wurde die hämolytische Wirkung Eiseniapores fast vollständig um 96.8% unterdrückt (Tab. 4.16). In der zusammenfassenden Darstellung (Abb. 4.18) ist die Inhibition Eiseniapores bei einer anti-C9 Antikörper Verdünnung von 1:100 dargestellt.



**Abbildung 4.18. Titer der Komplement- und Eiseniapore-induzierten Hämolyse in Gegenwart von Antikörpern und Regulatoren.** Der reziproke Wert des Komplementtiters beträgt 256. In Gegenwart von anti-Eiseniapore Antikörpern fällt der Hämolysetiter auf 64, die Kontrolle (+) zeigt, daß in Gegenwart von anti-C9 Antikörpern nur eine Aktivität von 4 Titerstufen bleibt. Der ERF inhibiert die Komplementlyse bis auf den Titer 16, der natürliche Inhibitor des Komplements Vitronectin (Kontrolle (-)) inhibiert die Hämolyse vollständig. Die Eiseniapore-vermittelte Hämolyse erreicht einen Titer von 6144, der in Gegenwart von anti-C9 Antikörpern auf einen Hämolysetiter von 384 fällt. Der gegen Eiseniapore gerichtete Antikörper (Kontrolle (+)) vermindert die lytische Aktivität mit einem Titer von 16 nahezu vollständig. Vitronectin reduziert die Eiseniapore-induzierte Hämolyse auf den Titer 192. Der natürliche Inhibitor Eiseniapore - der ERF - vermindert die Lyse auf den Titer 4.

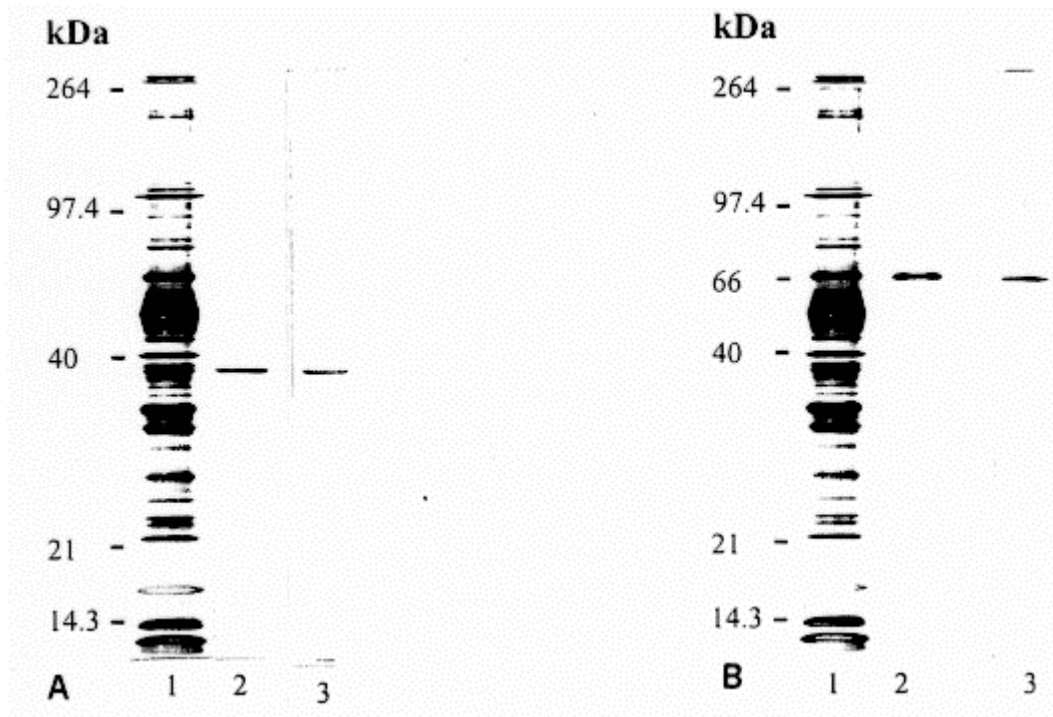
Anti-Eiseniapore Antikörper (1:500) unterdrücken die Komplement-vermittelte Hämolyse, der Komplementtiter von 1:256 wird in Gegenwart der Eiseniapore Antikörper um drei Titersufen auf 64 inhibiert.

**Tabelle 4.16.** Inhibitorische Wirkung von anti-C9 Antikörpern auf die hämolytische Aktivität Eiseniapore (n=4)

| Eiseniapore und Antiserum               | Inhibition der Hämolyse (%) |
|---|-----------------------------|
| Eiseniapore + anti-C9 Antiserum (1:500) | 50                          |
| Eiseniapore + anti-C9 Antiserum (1:10)  | 96,8                        |

#### 4.3.7. Immunologisch homologe Komponenten bei Säugern und Invertebraten - Analyse mittels Immunoblotting

Ein Immunostaining Eiseniapore und des ERF wurde mit Hilfe des Westernblots erreicht.



**Abbildung 4.19. Kreuzreaktion zwischen C9 und Eiseniapore (A) und zwischen Vitronectin und ERF (B).** Die Westernblots wurden mit monospezifischen, polyklonalen Antikörpern (1:1000, in PBS-Puffer verdünnt) gegen reduziertes, humanes C9 (A, rechte Bande) und humanes Vitronectin (B, rechte Bande) durchgeführt. Die elektrophoretische Trennung von 2.1 µg Eiseniapore (A, linke Bande) und 1.7 µg ERF (B, linke Bande) in der SDS-PAGE (5-10%) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen (siehe *Material und Methoden*).

Die Proteine wurde zunächst unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose-Membranen (blots) transferriert. Die danach sequentiell aufgetragenen Antikörper gegen humanes C9 und Vitronectin/S-Protein kreuzreagierten mit den aus dem Anneliden isolierten Eiseniapore und dessen Regulator (ERF) (Abb. 4.19.).

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Die humorale Abwehr bei Invertebraten

"Zellvermittelte Immunität" wurde ursprünglich als Begriff geprägt, um lokale Reaktionen gegen intrazelluläre Pathogene zu beschreiben, die durch Phagozyten und Lymphozyten mit ihren verschiedenen Populationen z.B. den 'natural killer' (NK)-Zellen vermittelt werden. Im Allgemeinen werden heute darunter Reaktionen verstanden, die durch die zellulären Komponenten der Immunantwort (z.B. T-Zellen und Makrophagen) verursacht werden. Zellulär- und humoral-vermittelte Prozesse können in vielen genutzten Tier- oder Gewebemodellen nicht getrennt beobachtet werden, da Zellen bei der Entstehung von Antikörpern beteiligt sind und Antikörper bedingt im Bereich der zellvermittelten Immunität als Bindeglied auftreten können<sup>30</sup>. Für eine getrennte Analyse der zellulär- und humoral-vermittelten Reaktionen ist es daher sinnvoll, evolutionär alte Tierstämme zu untersuchen, in denen diese beiden Reaktionen noch getrennt ablaufen, da in dem Abwehrsystem der phylogenetisch alten Stämme noch keine Antikörper zur Verfügung stehen.

In den letzten Jahren wurde dieses Antikörper-unabhängige Abwehrsystem der phylogenetisch alten taxonomischen Gruppen ein Schwerpunkt der immunologischen Forschung (Humphreys und Reinherz, 1994; Armstrong et al., 1996; Blanco et al., 1997; Hubert et al., 1997; Ottaviani und Franceschi 1997; Ram et al., 1997; Smith et al. 1997; Fearon, 1997). Hierfür wurden die Tierstämme aus dem Bereich der Invertebraten verwandt, für die bereits Daten ihres Abwehrsystems vorliegen. Denn erst durch längere Testreihen in Versuchen ist es möglich, wiederkehrende, saisonal stabile und in verschiedenen Modellen konstante, immunologische Faktoren herauszuarbeiten. Es sind dreikeimblättrige Tiere vorzuziehen, da das dritte Keimblatt in der Evolution das Gewebe für die Bildung von echten Immunmodulatoren ist (Cooper et al., 1992; Sima und Vetvicka et al., 1993; Vetvicka et al., 1994), und die entsprechenden Organismen somit bereits über einen komplexen Abwehrmechanismus verfügen. Bei Vertretern folgender Stämme:

- den Nemertinen (Langlet und Bierne, 1982),
- den Anneliden (Cooper, 1986) und
- Tunicaten<sup>31</sup> (Raftos et al., 1987)

---

<sup>30</sup> Zytolytische T-Zell Antworten laufen beispielsweise ohne Antikörper ab. Als Adaptor können Antikörper u.a. bei der Bindung an Phagozyten oder bei der Aktivierung von Komplement fungieren.

<sup>31</sup> Die Aufnahme der Tunicaten in die Gruppe der Invertebraten zeigt das Willkürliche des Systems Vertebraten/Invertebraten (siehe: *Einleitung*). Diese ursprünglichen Vertreter der Chordata gehören zu den Rückenmarktieren (Notoneuralia), wohingegen sich die Mehrzahl der wirbellosen Stämme bei den Bauchmarktieren (Gastroneuralia) einordnet.

konnten zum Beispiel bereits Transplantat-Unverträglichkeiten als sehr kompliziertes immunologisches Verhalten nachgewiesen werden. Diese Tiere müssen somit über ein gut entwickeltes Antikörper-unabhängiges Abwehrsystem verfügen. Von den drei genannten Stämmen, für die bereits spezifische Abwehrreaktionen gezeigt werden konnten, erfüllen die Kosmopoliten des Stammes der Anneliden die oben angeführten Voraussetzungen für das Studium des Abwehrsystems sehr gut.

Die Analyse von Vertretern eines Stammes läßt allerdings nur Aussagen über das Abwehrverhalten dieser Vertreter oder zum Teil des jeweiligen Stammes zu. Bei der Mannigfaltigkeit der wirbellosen Organismen sind Rückschlüsse auf die 'allgemeine' Immunologie der Invertebraten wohl nur sehr begrenzt möglich.

Das "August Krogh-Prinzip", wonach es für jedes Problem eine Tierart gibt, an der es besonders gut studiert werden kann, wurde in der vergleichenden Immunologie und Biochemie oft bestätigt (Urich, 1990). Wir denken, daß die lytische Aktivität der Anneliden in der Tierunterart *Eisenia fetida* ssp. -wegen des hohen Titors dieser Aktivität, den vielfältigen Voruntersuchungen und der Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials - am besten studiert werden kann.

## **5.2. Natürliche Killer-Zellen als Vermittler zytolytischer Reaktionen**

Im Jahre 1976 wurde bei humanen Lymphozyten eine Subpopulation gefunden, die ohne vorausgegangene Immunisierung, sozusagen natürlich, Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen in vitro zytotoxisch zerstören kann. Die Zellen wurden als 'natural killer' (NK)-Zellen bezeichnet. Obwohl ein Teil des lymphatischen Systems, lassen sie sich weder den B-Lymphozyten noch den T-Lymphozyten zuordnen. Somit scheinen sie direkt, ohne Prägung durch den Thymus, aus Vorläuferzellen des Knochenmarks zu stammen. Deshalb wurde vermutet, daß NK-Zellen als unspezifischer Abwehrmechanismus phylogenetisch sehr alt sind (Monti et al., 1992; Versteeg, 1992; Kapur et al., 1994). Anfang der neunziger Jahre gelang der Nachweis der Ähnlichkeit von zytotoxischen Hämözyten der Mollusken mit der Aktivität humaner NK-Zellen (Franceschi et al., 1991). Wenige Jahre später konnte die spontane Zytotoxizität der Cölomozyten aus *Eisenia fetida* ssp. als NK-ähnliche Aktivität gegen die humane Tumorzelllinie K 562 durch die morphologische Charakterisierung der Bindung von Effektor und Zielzelle gezeigt werden (Suzuki und Cooper, 1995, Quaglino et al. 1996). Die zytotoxische Aktivität wird dort von der Bildung multipler Aggregate ähnlich der Granulome begleitet. Bisher wurde dies nur in Säugern beobachtet. Granulome bestehen aus mehrkernigen Riesenzellen, Epitheloidzellen und aktivierten Makrophagen, die Infektionsherde dort abkapseln, wo antigenes Material nicht abgebaut werden kann, um es später zu lysieren.

Die zellvermittelte Lyse, die NK-Zellen im Abwehrsystem der Säuger einleiten, wird über porenbildende Proteine (wie Perforin) induziert. Für die von NK-Zellen sezernierten porenbil-

denden Proteine wird ein zwei-Schritt Mechanismus der Lyse vorgeschlagen: (1)  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung an Phosphatidylcholin und Sphingomyelin über Phosphorylkopfgruppen, die bei 0°C erfolgen kann und als Effektorzell-Zielzell-Konjugat über einen lektinähnlichen Rezeptor vermittelt wird, sowie (2) dem temperaturabhängigen Insertionsschritt, bei dem sich Kanäle in den Bilayer integrieren und nach weniger als 30 Sekunden den Lysevorgang der Zielzelle einleiten (Peitsch und Tschopp, 1991; Liu et al, 1995a,b).

Es wird zur Zeit spekuliert, ob eine in Invertebraten nachgewiesene NK-Zellen ähnliche Aktivität, von porenformenden Proteinen begleitet wird (Roch et al., 1989, Canicatti 1990, Porchet-Hennere et al., 1992). So wurden die sehr umfassend untersuchten zytotoxischen Cölomozyten des Anneliden *Nereis diversicolor* von mehreren Autoren - wenn bisher auch ohne Erfolg - auf immunologische Verwandtschaft mit dem humanen, porenbildenden Protein Perforin untersucht (Porchet-Hennere et al., 1992).

### **5.3. Isolierung und Charakterisierung von Eiseniapore**

Wir haben die Wechselwirkung des von uns erstmals bis zur Homogenität gereinigten Hämolysins (Eiseniapore) von *Eisenia fetida fetida* mit Bilayerstrukturen von Liposomen wie auch Membranen von Erythrozyten untersucht, um mögliche funktionsanalogue Prozesse zu anderen Porenformern aufdecken und analysieren zu können. Das Hämolysin wird nach gegenwärtigem Erkenntnisstand von Cölomozyten aus der Cölomflüssigkeit sezerniert, die als zytotoxisch beschrieben wurden (Sekizawa et al., 1996).

Die Reinigung Eiseniapores erfolgte mittels präparativer Elutionselektrophorese. Neben dem Tetanus-Toxin ist Eiseniapore eines der sehr wenigen Proteine, die bisher nach einem solchen Trennmodus und -schema isoliert wurden (DiMari et al., 1982). Die Elutionselektrophorese gestattet oft nur geringe Ausbeuten, ermöglicht aber die Aufreinigung von Proteinen, die eine hohe Affinität zu den Trennmaterialien der klassischen Säulenchromatographie besitzen. Diese Affinität führt dazu, daß eine Elution, zum Beispiel wegen überlappender Proteinpeaks, nur in geringem Ausmaß möglich ist (van Heyningen, 1976, 1980; Bizzini, 1979; Mohrig et al., 1996). Das Überlappen der Peaks kann durch die Aggregation der Proteine an dem Säulenmaterial unterstützt werden (DiMari et al., 1982). Zu dem Trägermaterial der Elutionselektrophorese - dem Polyacrylamidgel - hingegen, besitzen die Proteine der Cölomflüssigkeit diese sehr hohe Affinität nicht, somit ist eine Isolierung der interessierenden Fraktionen möglich.

Die Aktivität, gemessen als Hämolyse von Schaferythrozyten, steigt nach der Reinigung erstaunlicher Weise an. Normalerweise fällt die Aktivität der gereinigten Proteine durch Verluste während der Reinigungsprozedur ab. Die Erhöhung der Aktivität kann mit einer Konformationsänderung Eiseniapores oder aber mit einer im Trennungsgang erfolgten Abscheidung einer inhibierenden/regulierenden Struktur erklärt werden (Ehlers und Lange, 1992; Mohrig et al., 1997).



Das gereinigte Eiseniapore wurde dem Protokoll von Suelter folgend charakterisiert (Suelter, 1990). Eiseniapore ist danach ein thiolaktivierbares Hämolysin, das in seiner lytischen Aktivität von Anionen ( $\text{SO}_4^{2-} > \text{PO}_4^{3-}$ ) und Kationen ( $\text{Au}^{3+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ ) beeinflusst wird. Das Zytolysin von *Spiroraphis spallanzani*, von dem man annahm, es sei mit den Anneliden-Zytolysinen verwandt, ist hingegen nicht von Sulfhydryl- oder Disulfidgruppen abhängig (Canicatti und Roch, 1993). Somit konnten keine Hinweise für eine funktionale Verwandtschaft erbracht werden.

Mehrere Metallionen wurden bisher in Anneliden nachgewiesen, ohne daß man um ihre physiologische oder immunologische Bedeutung wußte (Ireland, 1978, Prento, 1979). Wir haben Metallionen genutzt, die in Anneliden nachgewiesen wurden, um ihre Bedeutung für die Wechselwirkung Eiseniapore-Targetmembran als Bestandteil der Immunreaktion zu analysieren.

Die Ionen mit der höchsten Oxidationszahl zeigten die deutlichste inhibierende Wirkung auf die lytische Aktivität Eiseniapores, was auf eine oxidative Schädigung von Eiseniapore durch die Reagenzien hindeutet. Wir konnten diese Überlegung durch unsere Beobachtung der unterschiedlichen Inhibierung des gleichen Metallions mit unterschiedlichem Oxidationsgrad belegen:  $\text{Fe}^{2+}$  besitzt ein geringeres inhibierendes Vermögen als  $\text{Fe}^{3+}$ . Metallionen greifen in viele physiologische und immunologische Prozesse ein: (i) Kationen öffnen oder schließen Ionenkanäle und makromolekulare Poren (Mlinar und Enyeart, 1993, Walker et al. 1994), (ii)  $\text{Au}^{3+}$  induziert allergische und autoimmunologische Effekte, außerdem sind für dieses Metall inhibierende Wirkungen auf die Komplementaktivierung oder die Antikörper-abhängige Zytotoxizität beschrieben worden (Harth, 1981, Griem und Gleichmann, 1995, Griem et al. 1996) und (iii) Metallionen sind wichtig sowohl für die Stabilität als auch die Änderung der Konformation von Proteinen (Lester und Brumfeld, 1991; Arnold und Zhang 1994; Chai et al, 1995; Reagan, 1995).

Um pharmakologische Wirkstoffe, die in Liposomen transportiert werden, an Krebszellen zu schleusen und dosieren zu können, wird zur Zeit intensiv mit in Liposomen integrierten porenformenden Proteinen experimentiert. Auslösern gesucht, um den sich normaler Weise geöffneten Kanal der porenformenden Proteine gezielt zu schließen. Metallionen (z.B. Zink) sind in der Lage solche Poren zu schließen (Song et al., 1996; Russo et al., 1997; Brahe et al., 1997).

Neben der inhibitorischen Wirkung mehrerer Metallionen war die sehr starke inhibitorische Aktivität einer sehr geringen Konzentration von  $\text{Au}^{3+}$  auf die hämolytische Aktivität von Eiseniapore auffällig. Auch wenn für  $\text{Au}^{3+}$  die Reduktion der Antikörper- und Komplement-vermittelten lytischen Aktivität beschrieben wurde, gibt es noch keine Deutung für diese modulatorischen Effekte (Harth, 1981).

Für die Analyse der Membranwechselwirkung von Eiseniapore haben wir die Bindungsreaktion experimentell von der lytischen Reaktion getrennt. Die Bindung von Eiseniapore an Membranen wird durch  $\text{Cu}^{2+}$  gesteigert, während diese Ionen die lytische Aktivität inhibieren. Es konnte gezeigt werden, daß die zwei Schritte (Bindung und Lyse) durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden können, das heißt, daß unterschiedliche Strukturen von Eiseniapore

für Bindung und Lyse verantwortlich sind. Somit muß die Bindung nicht automatisch zu einer lytischen Aktion führen.

Heparin und Lyso-PC verhindern die Bindung Eiseniaporen an die Erythrozytenmembran, aber nicht die Insertion in diese. Für Perforin wurde ein ähnliches Bindungs- und Lyseverhalten beschrieben (Ishiura et al., 1990, Ojcius und Ding-E Young, 1990). Heparin und Lyso-PC verhindern ebenfalls die Bindung von Perforin an die Targetmembran, jedoch nicht den lytischen Insertionsschritt von gebundenem Perforin. Dieser Effekt wird in Zusammenhang mit dem Selbstschutz der Perforin-freisetzenden Zellen diskutiert (siehe auch Kapitel "Wie schützt sich *Eisenia fetida fetida* vor der lytischen Aktivität Eiseniaporen?")

In Analogie zu einem anderen Mitglied der Perforin-Familie - der Komplementkomponente C9 - ist auch die Bindung von Eiseniapore nicht von  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig. Die lytische Aktivität von bereits gebundenem Eiseniapore erfordert keine der untersuchten Metallionen. Vitronectin, ein Inhibitor der lytischen Aktivität von Perforin und Komplement, setzt die Bindungsaktivität, aber nicht die lytische Aktivität von Eiseniapore herab. Für die regulierende Wirkung der lytischen Aktivität des Komplements und des Perforins durch Vitronectin wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet. Es wird diskutiert, daß durch die Anheftung von Vitronectin an die Komplement- und Perforinproteine die Bindung an die Zielmembran verhindert wird (Tschopp et al., 1987, 1990; Podack et al., 1983, 1991).

#### ***5.4. Eiseniapore induziert über einen Lipid-Rezeptor einen Leakage von Liposomen***

Nachdem Bindungs- und lytische Aktivität von Eiseniapore an Erythrozyten analysiert worden sind, wurde die lytische Aktivität an Targetmembranen mit Hilfe von Liposomen studiert. Eiseniapore ist in der Lage, Bilayerstrukturen so zu stören, daß eine Freisetzung der wäßrigen Phase des Lumens der Liposomen erfolgt. Die lytische Aktivität von Eiseniapore benötigt keine anderen Faktoren der Cölomflüssigkeit und ist durch polyklonale Antikörper gegen Eiseniapore und die Komplementkomponente C9 unterdrückbar. Die Aktivität ist an die native Struktur gekoppelt, denn es kommt zu einem völligen Verlust nach Denaturierung von Eiseniapore durch Hitzebehandlung. Eine essentielle Voraussetzung für den durch Eiseniapore vermittelten Leakage der Lipidmembranen ist die Gegenwart von verschiedenen Sphingolipiden wie Sphingomyelin oder Galactosylceramid. Die Anwesenheit von Sphingolipiden ist eine hinreichende, womöglich eine notwendige Voraussetzung für den Leakage von Lipidmembranen. In Abwesenheit der Sphingolipide war keine Lyse von Phosphatidylcholin-Liposomen feststellbar, weder in der Gegenwart von Phosphatidylserin noch von Phosphatidylethanolamin und Cholesterol. Ein Leakage von Liposomen wurde nur in Gegenwart von Sphingomyelin beobachtet, der sein Maximum bei neutralem pH-Wert, dem natürlichen pH-Wert der Cölomflüssigkeit, und bei einer Temperatur von 37°C besaß; oberhalb dieser Temperatur verringerte sich die Aktivität wieder. Bei einem Eiseniapore ähnlichen hämolytischen Protein, dem Lektin CEL-III

aus marinen Invertebraten, liegt das Maximum der lytischen Aktivität viel tiefer, es ist bei den Temperaturen von 10°C aktiver als bei 37°C (Hatakeyama et al., 1996). Beiden hämolytischen Proteinen ist somit gemeinsam, daß die Zunahme der lytischen Aktivität des Proteins nach einer bestimmten Temperaturerhöhung noch deutlich vor der Temperatur, bei der die Denaturierung erfolgt, wieder abnimmt.

Unsere weiteren detaillierteren Untersuchungen ergaben, daß folgende molekulare Merkmale der Sphingolipide notwendig für den Eiseniapore-vermittelten Leakage sind: (i) eine hydrophile Kopfgruppe wie Phosphorylcholin oder Galactosyl und (ii) das doppelkettige Rückgrat der Sphingolipide - das Ceramid.

Eine signifikante Steigerung des Eiseniapore-vermittelten Leakage von PC/SM-Vesikeln konnte in Anwesenheit von Cholesterol beobachtet werden. Cholesterol allein unterstützt die lytische Aktivität von Eiseniapore nicht; in Abwesenheit von Sphingomyelin wurde keine Markerfreisetzung beobachtet und der Leakage ist bei Austausch von Sphingomyelin durch Galactosylcerebrosid nicht erhöht. Diese Resultate implizieren eine Interaktion, vielleicht die Formation von Komplexen zwischen Cholesterol und Sphingomyelin, die für den erhöhten Leakage nach dem Einfügen von Cholesterol in PC/SM-Liposomen verantwortlich ist (Nieva et al., 1994, Moesby et al., 1995).

Cholesterol interagiert stark mit Phospholipiden, es soll dabei folgende Präferenzen zeigen: Sphingomyelin >> Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol > Phosphatidylcholin >> Phosphatidylethanolamin (Datta, 1987). Insbesondere die Studien, die eine Interaktion von Sphingolipiden wie den Gangliosiden oder den Cerebrosiden mit Cholesterol belegen, werden auch als Indikator für eine besondere Interaktion zwischen Sphingomyelin und Cholesterol herangezogen (Simons und Ikonen, 1997).

Slotte (1997) hingegen sieht in den bisherigen, folgenden, experimentellen Daten nur den sicheren Hinweis auf eine Differenz zwischen der Sphingomyelin- und Cholesterol-Wechselwirkung zum einen und der zwischen Phosphatidylcholin und Cholesterol zum anderen:

- Bilayer aus Cholesterol/Sphingomyelin sind für Wasser weniger permeabel als Cholesterol/Phosphatidylcholin Membranen (Barenholz, 1986)
- die Cholesterol-desorption in einer wäßrigen Phase ist von Sphingomyelin-haltigen Membranen geringer als die von Phosphatidylcholin-haltigen Membranen (Bittmann, 1993)
- der Kompressibilitätsmodulus in Sphingomyelin/Cholesterol Membranen ist größer als in Phosphatidylcholin/Cholesterol Membranen (Needham und Nunn, 1990)
- die Cholesterol-Oxidase-Aktivität ist in Sphingomyelin-haltigen Membranen geringer als in Membranen, die Phosphatidylcholin enthalten (Mattjus und Slotte, 1994)

Es wurde vermutet, daß die OH-Gruppe des dritten C-Atoms des Sphingosinrückgrats für die spezielle Interaktion Sphingomyelin und Cholesterol verantwortlich ist (Datta, 1987). Andere Membranlipide verfügen über diese Gruppe nicht. Die Modifizierung der 3-OH Gruppe des Sphingosinrückgrats beeinflusst die Oxidation von Cholesterol - einem Indikator der Stärke der

Wechselwirkung in Sphingomyelin-haltigen Membranen - aber nicht oder nur sehr wenig. Hingegen zeigt eine Variation der mit dem Amid verbundenen Fettsäurekette eine starke Veränderung der Rate der Cholesteroloxidation (Slotte, 1992, Bittman et al., 1994). Es ist daher möglich, daß diese Fettsäurekette und nicht die erwähnte OH-Gruppe für die laterale Interaktion von Cholesterol mit Sphingomyelin verantwortlich ist.

Obwohl bereits Daten vorliegen, die zeigen, *wie* Sphingomyelin und Cholesterol interagieren, weiß man bisher nicht, *warum* sie wechselwirken. Vermutlich wird die Homöostasis des phylogentisch jüngeren Cholesterols direkt vom evolutionär älteren Sphingomyelin beeinflusst.

Unsere Ergebnisse des Leakage von Sphingomyelin- und Cholesterol-haltigen Membranen geben einen deutlichen Hinweis auf die von mehreren Autoren diskutierten Sphingomyelin/Cholesterol Komplexe oder Mikrodomänen (Grönberg et al., 1991; Slotte, 1992; Simons and Ikonen, 1997). Ein starkes Indiz hierfür ist neben dem erhöhten Leakage von PC/SM-Liposomen nach Einbau Cholesterols vor allem die Tatsache, daß in Liposomen, in denen Sphingomyelin durch Galactosylceramid ersetzt wurde, kein erhöhter Leakage nachzuweisen ist. Das ist deshalb bedeutsam, da gezeigt werden konnte, daß Galactosylceramid im Gegensatz zu Sphingomyelin mit Cholesterol nicht spezifisch interagiert (Slotte et al., 1993).

Da mit anderen Methoden, wie der Langmuir'schen Balancetechnik an Monolayern, widersprechende Resultate zu der Cholesterol/Sphingomyelin Wechselwirkung gewonnen wurden (Smaby et al., 1996), kommt unseren Experimenten, die biologisch wirksame Faktoren nutzen, eine wichtige Bedeutung zu. Neben dem Modell der Semliki-Forest-Virus vermittelten Membranfusion, der für den Bindungsschritt Cholesterol, für das eigentliche Fusionsereignis aber Sphingomyelin benötigt (Nieva et al., 1994, Moesby et al., 1995), sind unsere Versuche zur Membraninterruption durch Eiseniapore ein weiteres biologisches Beispiel, das eine spezielle Wechselwirkungen von Sphingomyelin mit Cholesterol aufzeigt. Es ist der erste Nachweis, der eine immunologische 'Verwendung' dieser Interaktion dokumentiert.

Die Resultate unterstützen die These der essentiellen Rolle von Sphingolipiden bei dem Leakagevorgang, sie legen die Notwendigkeit von Sphingolipiden auch bei der Bindungsreaktion sehr nahe. Die Vorinkubation von Eiseniapore mit Liposomen verschiedener Lipidkompositionen ohne Sphingomyelin veränderte den folgenden Eiseniapore-vermittelten Leakage von PC/Chol/SM Liposomen nicht. Im Gegensatz dazu wurde kein Leakage von gelabelten PC/Chol/SM Liposomen gemessen, wenn Eiseniapore mit ungelabelten Liposomen gleicher Zusammensetzung vorinkubiert wurde. Diese Versuche machen deutlich, daß die Bindung von Eiseniapore an Liposomen, die Sphingolipide wie Sphingomyelin enthalten, notwendigerweise irreversibel ist. Eine Bindung von Eiseniapore an Lipidmembranen erfolgt ohne Sphingomyelin nicht, deshalb können andere Lipide - wie Cholesterol (dem Rezeptor Thiol-aktivierbarer Toxine aus Bakterien (Braun und Focareta, 1991))- als Rezeptor ausgeschlossen werden.

Weder die Anwesenheit von Phosphatidylserin noch von Phosphatidylethanolamin allein

konnten PC-Liposomen für die Aktivität von Eiseniapore zugänglich machen, sie waren auch nicht notwendig für den Leakage von SM-Liposomen. Solange Sphingomyelin anwesend ist, bedarf es keiner weiteren Rezeptoren.

Elektrostatistische Interaktionen scheinen bei dem erhöhten Eiseniapore-vermittelten Leakage der Erythrozytenmembran nachempfundene Liposomen keine herausragende Rolle zu spielen, da PC/PS Liposomen nicht lysiert wurden. Dennoch war die lytische Aktivität bei 'resealed ghost' noch höher als bei Liposomen mit der Lipidzusammensetzung der Erythrozytenmembranen. An 'resealed ghost' wurde das höchste Ausmaß von allen getesteten unilamellaren Vesikeln beobachtet<sup>32</sup>.

Systematische Untersuchungen zur Wechselwirkung unterschiedlicher Lipide mit Zytolysinen/Hämolysinen anderer Invertebraten liegen bisher nur sehr wenig vor. Eine Ausnahme bildet das Zytolysin A-III des marinen Wurmes *Cerebratulus lacteus* (Kem, 1994). Es ist das einzig isolierte Toxin aus dem 800 Arten umfassenden Stamm der Nemertinen. Wird dieses Polypeptid mit ultrabeschallten Dispersionen verschiedener Lipide vorinkubiert und anschließend dessen hämolytische Aktivität bestimmt, zeigen sich inhibitorische Effekte bestimmter Lipide. Ein Hämolysenhemmung von 50% (definiert als LD<sub>50</sub>) ergibt sich schon bei geringer Konzentration von Gangliosiden (LD<sub>50</sub>: 2 µg/ml) und Sphingomyelin (LD<sub>50</sub>: 5 µg/ml Lipid). Inhibitorische Effekte sind ebenfalls bei Sphingosin (LD<sub>50</sub>: 60 µg/ml Lipid), Phosphatidylinositol (LD<sub>50</sub>: 80 µg/ml Lipid), Phosphatidylserin (LD<sub>50</sub>: 105 µg/ml Lipid) und Cerebrosid (LD<sub>50</sub>: 150 µg/ml Lipid) bestimmbar. Über 500 µg/ml Lipid sind bei Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Ceramiden und Cholesterol erforderlich, um die Hämolysen von A-III zu beeinflussen. Auch wenn die Hämolysenexperimente mit Lipiddispersionen Vorversuche darstellen, sind gewisse Aussagen über die Lipid-Peptid Interaktionen möglich. Sphingomyelin könnte neben Gangliosiden ein Lipidrezeptor für das Zytolysin A-III darstellen.

In Leakageversuchen ist der mögliche Austausch von Sphingomyelin durch Ganglioside als Rezeptor auch für Zytolysine des Stammes der Cölenteraten beschrieben worden (Macek et al., 1994, Kem, 1994). Für Eiseniapore fanden wir hierfür keine Hinweise. Sphingolipide ließen sich durch Ganglioside bei der Lyse von Liposomen als Rezeptor nicht ersetzen.

Bei allen getesteten unilamellaren Vesikeln war für die großen unilamellaren Vesikel (LUV) ein geringerer Leakage als für die kleinen unilamellaren Vesikel (SUV) bestimmbar.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind Leakageexperimente mit vergleichenden Versuchen von SUV und LUV nur noch mit den lytischen Toxinen aus Cölenteraten durchgeführt worden. Hier wurde bei LUV mit vergleichbaren Konzentration ein größerer Markerausfluß als bei SUV

---

<sup>32</sup> Hierfür könnte auch eine mögliche labilere Membranintegrität der 'resealed ghost' verantwortlich sein.

beobachtet (Macek et al., 1994).

Die Ergebnisse der Charakterisierung von Eiseniapore als Thiol-aktivierbares Zytolysin und der Nachweis der Lipide, die notwendig sind, um einen Leakage zu induzieren, gestatten bereits eine erste Einordnung in das System der lytischen Proteine und Toxine. Bernheimer (1996) beschreibt 17 Toxine von unterschiedlicher Cölenteraten<sup>33</sup>, deren lytische Aktivität sämtlich durch Sphingomyelin inhibierbar ist. Überraschender Weise gibt es jedoch ein Toxin von *Metridium senile*, das nicht durch Sphingomyelin beeinflusst wird, es wird jedoch im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Toxinen durch Thiolgruppen aktiviert. Bernheimer (1996) verweist auf ähnliche Ergebnisse bei den Zytolysinen von Bakterien oder den membranzerstörenden Toxinen der Arachnida (Spinnen) und schlägt wegen der Universalität dieses Phänomens über sehr große taxonomische Gruppen hinweg (Bacteria, Cölenterata und Arthropoda) eine Grobansprache der Toxine in die Familie der Thiol-aktivierbaren und die der Sphingomyelin-inhibierbaren vor. Für bereits weitergehend untersuchte Toxine konnte gezeigt werden, daß Thiol-aktivierbare lytische Proteine immer von Cholesterol in ihrer lytischen Aktivität inhibiert werden können (Haque et al., 1992). Eiseniapore ist das erste beschriebene membranaktive Protein/Toxin, das sowohl durch Thiol-Gruppen aktivierbar und zugleich durch Sphingomyelin inhibierbar ist. Untersuchungen für Porenformer - Perforin, Komplementfaktoren oder antimikrobielle Peptide - in Säugern oder auch in Wirbeltieren fehlen, da man sie per Definition nicht als Toxine begreift und sie so von direkten vergleichenden Untersuchungen ausschließt. Die Kopfgruppe des Sphingomyelins wird jedoch als Rezeptor für Perforin diskutiert (Antia et al., 1992).

#### ***5.5. Existiert neben dem Lipid-Rezeptor zusätzlich ein Protein- oder Kohlenhydrat-Rezeptor für Eiseniapore?***

Für bakterielle Toxine, die enzymatisch lytisch wirken, sind Rezeptoren auf der Targetmembran beschrieben worden:

- Diphtheria-Toxin, Rezeptor: 14,5 kDa Bindungsprotein im Komplex mit einem 27 kDa Protein (Williams et al., 1990; Papini et al., 1991),
- Cholera-Toxin, Rezeptor: GM<sub>1</sub> (Moss und Vaughan, 1988),
- Verotoxin, Rezeptor: Globotetraosylceramid (Jacewicz et al., 1991) und
- Botulinum-Neurotoxin, Rezeptor: Sialosylgruppen (Schantz und Johnson, 1992). Jedoch liegen für die porenformenden Bakterientoxine erst wenige Ergebnisse vor (referiert bei Li, 1994).

Dieser Mangel an Informationen ist jedoch nicht auf bakterielle Porenformer beschränkt. Für

---

<sup>33</sup> Hierbei handelt es sich überwiegend um Vertreter der Actinia (Seeanemonen).

porenbildende Proteine aller taxonomischen Gruppen gibt es insgesamt erst wenig Kenntnisse über ihre Rezeptoren. So wurden kürzlich zwei lytische Proteine aus *Eisenia fetida andrei* ("Fetidine") isoliert. Für die Analyse eines möglichen Rezeptors wurden von den Autoren künftige Versuche mit Vesikeln unterschiedlicher Zusammensetzung vorgeschlagen (Milochau et al., 1997). Die von uns durchgeführten Versuche gestatten einen Ausblick auf einen möglichen Rezeptor mit einer Lipidstruktur: den Sphingolipiden. Um die Frage abzuklären, ob neben den Sphingolipiden auch eine Kohlenhydratstruktur oder ein Protein als Rezeptor existiert, nutzten wir Erythrozytenmembranen. In 'resealed ghost' (geschlossene Ghosts) wurde dazu ANTS/DPX eingeschlossen. Der Durchmesser dieser 'resealed ghosts' wurde durch Herstellung sogenannter Erythrosomen mittels Extrusion denen der LUV (Durchmesser 100 nm) angeglichen. Somit war ein direkter Vergleich zwischen der reinen Lipidmembran der LUV, die die Lipidkomposition der äußere Erythrozytenmembran widerspiegeln, und der biologischen Membran der 'resealed ghost', die neben den Lipiden auch Proteine enthält, möglich. Bisher ist ein solcher Vergleich noch nicht durchgeführt worden, da man annahm, daß dieses neue Derivat aus Ghosts (Nanoerythrosomen) weitestgehend inert gegenüber membranaktiven Substanzen sei (Lejeune et al., 1997). In den durchgeführten Versuchsreihen konnte kein Unterschied im Ausmaß des Leakage bei LUV, die den äußeren Lipidlayer der Plasmamembran bei Erythrozyten nachbildeten, und Nanoerythrosomen gemessen werden. Wir gehen deshalb davon aus, daß ein spezieller Proteorezeptor oder eine Kohlenhydratstruktur, als Rezeptor fungierend, nicht existiert. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß neben Sphingolipiden als Rezeptor für Eiseniapore weitere Rezeptoren für die Wechselwirkung mit reinen Lipid- oder mit biologischen Membranen wie der Erythrozyten - der experimentiell am häufigsten genutzten Zielzelle für die Analyse lytischer Proteine - nötig sind. Die hier erstmals verwandte Methode des Leakagesvergleichs von Vesikeln gleichen Durchmessers mit biologischen proteinhaltigen und reinen Lipidmembranen, bietet auch einen Ansatz für die Beantwortung ähnlicher Fragestellungen bei anderen lytischen Proteinen/Peptiden. So konnte beispielsweise an Hand der Leakage- und Hämolyseversuche nicht abgeklärt werden, ob das  $\alpha$ -Hämolysin der pathogenen *E. coli* Stämme über einen Rezeptor mit der Targetmembran, die auch hier die Membran von Erythrozyten ist, wechselwirkt (Ostolaza et al., 1993, 1997).

Diese Ergebnisse lassen weitreichende Schlüsse für die Invertebraten-Immunologie zu. Den Hämolysinen in Invertebraten, zu denen auch Eiseniapore zu rechnen ist, wurde bislang eine Funktion in der Abwehr von pathogenen Bakterien zugeordnet. Denn eine biologische Aktivität in Invertebraten gegen Erythrozyten von Vertebraten wäre ohne immunologischen Sinn, auch wenn ein solcher diskutiert worden ist (Roch et al., 1987). Das gereinigte Hämolysin Eiseniapore benötigt jedoch für die Interaktion mit Targetmembranen Lipid-Rezeptoren (Sphingolipide), die auf der Membran von Bakterien nicht vorkommen<sup>34</sup>. Hieraus ergeben sich mehrere interessante

---

<sup>34</sup> Für Perforin wird ebenfalls eine antibakterielle Wirkung diskutiert (Liu et al., 1995). Die bisher beschriebenen Rezeptoren Phosphatidylcholin und Sphingomyelin kommen jedoch in der bakteriellen Membran nicht vor.

Schlußfolgerungen. Es wäre möglich, daß Eiseniapore eher den Schutz gegen Protozoen und metazoische Parasiten realisiert. Bakterien wären damit ein interessantes Objekt für das Studium weiterer möglicher Immunmechanismen, sowie zusätzlicher Eiseniapore-Rezeptoren (siehe auch Kapitel *Kohlenhydratsbindungs-Eigenschaften von Eiseniapore*). Außerdem ist es möglich, daß für den Schutz vor Bakterien ein spezieller -nicht mit Eiseniapore in Zusammenhang zu bringender- Mechanismus (z.B. antibakterielle Peptide auf der Hautoberfläche) existiert.

Die hier vorlegten Ergebnisse erweitern und stützen die Resultate über die Bedeutung der Wechselwirkung von Sphingolipiden und Hämolysinen anderer Invertebraten. Es handelt sich hierbei um die phylogenetisch sehr weit auseinanderstehenden Gruppen der Cölenterata, Echinodermata und Tunicata (Canicatti et al., 1987, Macek et al., 1994, Parrinello et al., 1995, Meinardi et al., 1995). Die Cölenterata gehören zu den frühen Gewebetieren, denen alle Protostomia folgen, die ihren Abschluß in den Arthropoden mit den Insekten finden. Der Entwicklungszweig, den die Echinodermata und Tunicata markieren, führt als Zweig Deuterostomia zu den Vertebraten mit den Säugern. Mit unseren Ergebnissen über Anneliden wird erstmals die Sphingolipid-Wechselwirkung eines lytischen Proteins von einem Organismus, der bereits über drei Keimblätter verfügt - und somit ein erster Vertreter der Protostomier, der das Organisationsniveau von sogenannten echten "Organtieren" erreicht - beschrieben.

Die Parasiten dieser Invertebraten (Cölenterata, Echinodermata) und speziell der Annelida<sup>35</sup> besitzen als typischen Bestandteil ihrer Lipidkomposition Sphingolipide: Ciliaten, Gregarinen (meist aus der Familie Monocystidae), Cestoden und Nematoden (Kaneshiro, 1987; Maloney und Semprevivo, 1991; Nishimura et al., 1991; Satouchi et al., 1993; Chitwood et al., 1995; Lucius und Loos-Frank, 1997). Die Membran dieser Parasiten ist somit durch Eiseniapore angreifbar; unterstützt wird diese Überlegung durch die Beobachtung, daß sie in der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* nicht überleben können. Wenn diese Parasiten aus dem Gewebe in den Cölomraum eindringen, greift ein noch nicht verstandener Abwehrmechanismus, der die Parasiten abtötet (Valembois et al., 1992; Kauschke, persönliche Mitteilung).

### ***5.6. Strukturelle Eigenschaften von Eiseniapore***

Mittels Elektronenmikroskopie konnten in Sphingomyelin-haltigen Targetmembranen regelmäßige Porenstrukturen Eiseniapores mit einem Innen- und Außendurchmesser von 2-3 nm und 10 nm sichtbar gemacht werden. Das an die Membran gebundene Eiseniapore formt eine aus sechs Monomeren bestehende oligomere Porenstruktur, die sehr stabil ist. Sie wird erst nach 30 Minuten kochen in der Gegenwart von reduzierenden Reagenzien zerstört. Die Stabilität der Pore

---

<sup>35</sup>Insgesamt ist die Literatur zu Parasiten von *Eisenia fetida* ssp. wenig umfangreich. Einige jüngere Publikationen (Edwards und Lofty, 1972; Peters und Walldorf, 1986) stehen für die Parasiten von *Lumbricus terrestris* (Gemeiner Regenwurm) zur Verfügung, als aktuellste Publikation ist Lucius und Loos-Frank (1997) zu nennen.



in Gegenwart von Detergenzien und der - in 'osmotischen Schutzexperimenten' bestimmte - definierte Porennendurchmesser lassen die Vermutung zu, daß Eiseniapore sich als ein sogenannter "protein-walled channel" (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1991b, siehe *Einleitung*, Abb.1, Modell B) in die Membran integriert.

Der von Eiseniapore induzierte Leakage von reinen Lipidmembranen und biologischen Membranen läßt sich über eine Reaktion zweiter Ordnung beschreiben, da die Halbwertszeit des Anstieges, aufgetragen gegen den reziproken Wert der Proteinkonzentration, in erster Näherung eine Gerade ergibt. Somit agiert das Protein an einen bestimmten Punkt des Leakageprozesses als Dimer.

Bei humanen antimikrobiellen Defensinen (Hristova et al., 1996), zytolytischen Toxinen der Bakterien (van der Goot et al., 1993), Enzymen (Robertson und Mathews, 1996) insbesondere den HIV-1 Proteasen (Grant et al., 1992) wird der Wechsel von der löslichen, hydrophilen zur membranassoziierten, lipophilen Konformation über eine Dimerisierung des Peptids/Proteins ermöglicht.

Es wird gegenwärtig diskutiert, ob die Struktur eines Dimers eine notwendige Voraussetzung für die Formation einer Pore ist (Hristova et al., 1996)<sup>36</sup>. Es wäre sogar möglich, die individuelle Herausbildung einer Pore (und die Bedeutung des Dimers) in der Phylogenese dieser Struktur wiederzufinden und zu diskutieren. Die wenigen zur Verfügung stehenden Daten gestatten nur ein einfaches Bild für die Verbindung von Aggregaten oder Poren aus Proteinmonomeren in der Evolution: (i) eine Genfusion (Gilbert, 1978) führt zu einer Verbindung von zwei Proteinen unterschiedlicher Funktion über eine Polypeptidkette, das so entstandene primitive, geschlossene Monomer erhält eine (ii) c-Schnittstelle (c - losed) zwischen den Untereinheiten und wird so zu einem primitiven, aktiven und geschlossenen Monomer, ähnlich wie es sich in heutigen, rezenten Multidomänen-Proteinen darstellt. Das aktive Monomer könnte sich im Gleichgewicht mit einem (iii) Dimer befinden, welches durch Domänentausch (Piccoli und D'Alessio, 1984; Bennett et al., 1995) entsteht. Hierbei wird die Domäne als globuläres Areal - oder ein Element einer sekundären Struktur - definiert. Ein Domänentausch in einem Dimer beschreibt die Verflechtung der Domäne einer Proteinkette mit dem identische Umfeld einer gleichen Domäne eines anderen Monomers. Die (iv) rezenten, stabilen Dimere weisen für die Öffnung und Bildung von Oligomeren zusätzlich eine sogenannte o-Schnittstelle (o - open) auf (Bennett et al., 1994) (siehe auch Kapitel 5.8. "Warum so kompliziert?").

Die Sekundärstruktur Eiseniapores besteht überwiegend aus  $\beta$ -Strukturen, vor allem aus  $\beta$ -sheets. Über porenbildende Proteine mit einem hohen Anteil an  $\beta$ -sheet ist bisher sehr wenig bekannt (van der Goot et al., 1994), auch wenn ein hoher Anteil an  $\beta$ -sheet nicht ungewöhnlich für Proteine zu sein scheint, die in einer oligomeren Form mit Membranen interagieren, zum

---

<sup>36</sup> Es kann somit spekuliert werden, ob die Porenkomplexe von Eiseniapore (EP) über ein Dimer:  $6 EP \rightarrow 3 EP_2 \rightarrow EP_6$  gebildet werden.

Beispiel: Poly-C9 des Komplementsystems (Podack und Tschopp, 1982), das *Staphylococcus*  $\alpha$ -Toxin (Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991a; ausführlich referiert: Lesieur et al., 1997), Aerolysin, dem zytolytischen Exotoxin von *Aeromonas hydrophila* (van der Goot et al., 1994) und das  $\theta$ -Toxin von *Clostridium perfringens* (Perfringolysin O) (Nakamura et al., 1995). Durch Messung des CD-Spektrums wurde kein Hinweis für eine Neuordnung der Sekundärstruktur Eiseniaporen, wenn eine Bindung an Sphingomyelin-haltige Membranen erfolgt, gefunden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß eine mögliche Änderung bestimmter Proteinabschnitte durch Veränderung anderer Bereiche kompensiert wird und somit im Gesamtspektrum nicht sichtbar wird. Im Gegensatz dazu fanden wir jedoch deutliche Veränderungen der Tryptophanfluoreszenz, die mit einer Neuorientierung der Tertiär- oder Quartärstruktur bei Anwesenheit von Sphingomyelin-haltigen Membranen erklärt werden kann. Bisher wurde die Veränderung der Tertiärstruktur ohne Modifizierung der Sekundärstruktur - sie soll die energetisch günstigste sein (van der Goot et al., 1994) - nur bei der Membraninsertion von Colicin A (Lakey et al., 1991, van der Goot et al., 1991) und Aerolysin (van der Goot et al., 1992), zwei bakteriellen porenformenden Proteinen, beobachtet.

### 5.7. Wie schützt sich Eisenia fetida fetida vor der lytischen Aktivität Eiseniapores?

Zeitgleich wurde von zwei Arbeitsgruppen auf die mögliche Rezeptorwirkung verbunden mit einer Funktion in der Selbst/Fremderkennung von Sphingomyelin bei den potenten Hämolytinen von Cölenteraten beziehungsweise von Anneliden hingewiesen (Meinardi et al., 1995; Lange et al., 1995). Obwohl die Lipidanalyse verschiedener Gewebemembranen der Anneliden noch nicht abgeschlossen ist, scheint es, daß Sphingolipide in Membranen von Anneliden nur gering oder nicht vertreten sind (Karnosky, 1969; Albrow et al., 1992; Hori and Sugita, 1993). Das Nervensystem der Anneliden, welches den Cölomraum mit dem dort gebildeten lytisch aktivem Eiseniapore passiert, ist im Gegensatz zu anderen Wirbellosen, bei denen Sphingomyelin eine Hauptkomponente des Nervensystems bildet, völlig frei von Sphingomyelin (Okamura, 1985a). Ein anderer Rezeptor Eiseniapores, Galactosylceramid, ist im Nervengewebe von Anneliden durch andere Ceramide ersetzt worden (Okamura, 1985b). Bei jüngeren Nachweisen von Galactosylceramiden in Anneliden, wie dem mit *Eisenia fetida fetida* oder *Lumbricus terrestris* eng verwandten *Pheretima asiatica* (Tanaka et al. 1996), stammen die Tiere aus kommerziellen Unternehmen und es können keine Aussagen über Hälterung und Nahrungszusammensetzung gemacht werden. So fehlt genau den Arbeiten, in denen der Nachweis von Gangliosiden oder Ceramiden gelang, ein Hinweis auf eine vorgeschaltete Diät der Tiere. Es wurden immer Tiere mit ihrem Darminhalt, einschließlich der bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Rückstände, homogenisiert, was keine eindeutige Analyse gestattet.

Die lytische Aktivität von Eiseniapore wird - wie bei Perforin - durch Lysolipide herabgesetzt. In Lipidkomposition von Anneliden konnten ungefähr 5,5% Lysolipide (bezogen auf die Gesamtlipidmenge) nachgewiesen werden (Albrow et al., 1992). Damit sind sie in Anneliden die dritthäufigste Phospholipidfraktion. Der inhibierende Effekt von Lysolipiden auf die Perforin-vermittelte Hämolyse wird im Zusammenhang mit dem Selbstschutz der Perforin-sezernierenden Zellen diskutiert.

Die biochemisch aufwendige Modifizierung bestimmter körpereigener Lipide, die sich dann von den Lipiden des Target unterscheidet, scheint für die selbst/fremd-Erkennung in der Evolution nur wenig verfolgt zu sein. Eine Ausnahme bilden die Vertreter des Stammes Cölenterata, sie produzieren Zytolysine, die als Lipidrezeptor das bei ihren potentiellen Gegnern vorhandene Sphingomyelin nutzen (Macek et al., 1994). Sie selbst schützen sich nicht durch Abwesenheit dieses Lipids, sondern mittels Substituierung durch ein Phosphonoanalog. Da Phosphonosphingolipide mit dem Toxin nicht interagieren, ermöglichen sie so eine Selbst/Fremdselektivität (Meinardi et al. 1995) und so den Schutz vor den eigenen Toxinen.

Insgesamt scheint es schwierig, vergleichende biochemische Überlegungen der zytolytischen Proteine mit einem phylogenetischen Entwicklungssystem der Lipide abgleichen zu wollen. In jedem Tierstamm sind einzelne Lipide so stark modifiziert worden, daß man von eigenständigen chemischen Strukturen sprechen kann, die kaum einen entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang erkennen lassen. Viele Lipide lassen sich außerdem auch nicht durchgängig in der Ent-

wicklungsgeschichte nachweisen. Dies belegt beispielsweise die "eigentümliche Verbreitung" (Urich, 1990) der Ganglioside, sie kommen nur in Echinodermaten und dann Millionen Jahre später wieder in den Wirbeltieren vor. Dies macht es unmöglich, einen Stammbaum der Ganglioside zu skizzieren. Nachweise von Gangliosiden in *Lumbricus terrestris* sind vermutlich mit der Nahrungszusammensetzung der gehälterten Tiere erklärbar; Hinweise für eine in vivo Produktion als endogene Lipide fehlen bei den Anneliden wie auch bei allen anderen Protostomiern (Albro et al., 1992; Albro et al., 1993).

### 5.8. "Warum so kompliziert?"

Mit dieser Frage schloßen Parker et al. (1996) ihre umfassende Analyse über das Aerolysin - einem bakteriellen kanalformenden Protein. Die Autoren bezogen sich insbesondere auf die Größe und die verschiedenen Domänen des Proteins. Diese Frage scheint deshalb berechtigt, da Peptide, wie das aus nur 7 Aminosäuren bestehende extrem kleine Subtilysin von *Bacillus subtilis*, hinreichende zytolytische Wirkung besitzen, obwohl sie nicht einmal die notwendige Anzahl von 21 Aminosäuren besitzen, die mindestens erforderlich sind, um die Membran zu durchspannen (Hemminga, et al. 1992). Warum entstanden bereits mit den ersten, komplexen Gewebetiere (Eumetazoa) -ein rezenter Vertreter ist z.B. die Cnidarie *Physalia physalia* ("Portugiesische Galeere")- riesige Zytolysine (240 000 Dalton bei *Physalia*), wenn auch sehr kleine Peptide als sogenannte 'low cost products' ausreichend lytisch wirken konnten (Bernheimer, 1996)?

Eine befriedigende Antwort ist vermutlich erst möglich, wenn die vergleichende Sichtweise durch eine phylogenetische erweitert wird. Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß poren- oder kanalbildende Mechanismen der Membranpermeabilisierung die in der Natur favorisierten sind und in vielen pathogenen Vorgängen eine herausragende Rolle spielen. Das Problem der Regulation des Prozesses der Kanalbildung und der Schutz vor Autolyse durch Inhibitoren rückt deshalb gegenwärtig in das Zentrum des Interesses (Canicatti, 1990; Franceschi et al., 1991; Milochau et al., 1997; Leippe, 1997). Die von Parker et al. (1996) zitierte Frage ließe sich unter anderem in dem Sinne beantworten, daß in der Evolution der Schritt vom einfachen, membranaktiven Peptid zum komplexen, membranaktiven Protein gegangen werden mußte, um in höher spezialisierten Organismen Effekte der Aktivierung, Regulation und Inhibierung der porenbildenden und lytischen Aktivität zu ermöglichen. Diese Überlegung wird durch folgende Beobachtung gestützt: Wie bei der Reinigung von Eiseniapore ist in der Literatur auch für einzelne andere lytische Proteine beschrieben worden, daß ihre Aktivität nach der Reinigung erhöht ist.

Bei dem  $\alpha$ -Hämolysin von *Escherichia coli* (Nistiar et al., 1991) wurde eine Steigerung der Aktivität beobachtet. Eine Steigerung um das 31.6-fache über drei Reinigungsschritte wurde für das 40-kDa Hämolysin von *Strongylcentrotus nudus* beschrieben (Osada et al., 1993). Es wird eine Konformationsänderung des lytischen Proteins, vor allem aber die Abtrennung eines

regulierenden Mechanismus' oder eines Inhibitors durch die Reinigungsprozedur diskutiert. Für lytische Peptide sind im Gegensatz zu den lytischen Proteinen keine durch die Reinigung bedingten Aktivitätssteigerungen beschrieben worden.

Diesen Resultaten folgend, erscheint die Anwesenheit eines Regulators bei Anneliden wahrscheinlich. Milochau et al. (1997) charakterisierten die hämolytische Aktivität der gesamten Cölomflüssigkeit im Vergleich mit den isolierten hämolytischen Proteinen (Fetidine) von *Eisenia fetida andrei*. Die Autoren diskutieren die so gewonnenen Ergebnisse<sup>37</sup> mit der Anwesenheit von anderen, nicht näher charakterisierten Molekülen in der vollständigen Cölomflüssigkeit, welche die Bindung der lytischen Proteine an die Membran verhindern.

Der von uns erstmals für Invertebraten nachgewiesenen Inhibitor der lytischen Aktivität, der 67 kDa große Eiseniapore-regulierende Faktor (Ehlers und Lange, 1992; Lange 1995; Mohrig et al., 1997), könnte für die Deutung des Verlaufes der von Milochau et al. (1997) gemessenen Dosis-Wirkungs-Kurve der Hämolyse und die Aktivitätssteigerung nach erfolgter Reinigung herangezogen werden. Dieser zum Teil stimulierbare Regulator wurde bei verschiedenen europäischen Anneliden nachgewiesen (Mohrig et al., 1997).

Proteine, die nach den bisherigen Informationen durch Regulatoren supprimiert werden, nehmen einen Molekulargewichtsbereich von 30 bis 70 Kilodalton ein. Die Entwicklung von 'gigantischen Zytolysinen', ihr Molekulargewicht liegt zwischen ungefähr 200 bis 400 Kilodalton, könnte ein Versuch gewesen sein, Einheiten zu schaffen, die nicht durch äußere Strukturen reguliert werden, sondern selbstregulierend sind (siehe auch: Parker et al., 1996). Ähnlich wie bei den kleinen lytischen Peptiden finden sich für diese sehr großen Zytolysine keine Hinweise auf regulierende Proteine.

### **5.9. Die Aktivität Eiseniapores wird durch Kohlenhydrate beeinflusst**

Sinkora et al. (1993) identifizierten ein 38 kDa Protein mit opsonierenden Eigenschaften in der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida* ssp. Wright führte den Begriff *Opsonine* 1903 für Serumbestandteile ein, die eine Bindung von Bakterien und partikuläre Antigene an Phagozyten vermitteln und so den sich anschließenden Prozeß der Phagozytose fördern. Gegenwärtig gelten alle Faktoren, die phagozytosefördernd oder für die Komplement-abhängige Lyse von invasiven Mikroorganismen nötig sind, als Opsonine. Es gibt Hinweise für eine Koppelung der hämolytischen und der opsonierenden Aktivität in Anneliden. Synthetische 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)-Copolymerpartikel, die in der Cölomflüssigkeit opsoniert werden und so zu einer Erhöhung ihrer Phagozytose durch freie Cölomozyten führen, verringern die hämolytische Aktivität der Cölomflüssigkeit (Sinkora et al., 1993). Da für lytische Komponenten in Lumbrici-

---

<sup>37</sup> Der Wert der induzierten Hämolyse steigt mit der Konzentration der zugegebenen lytischen Proteine. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt bei den isolierten Proteinen einen sigmoidalen Graphen der Hämolyseaktivität, im Gegensatz dazu ist die Dosis-Wirkungs-Kurve der vollständigen Cölomflüssigkeit biphasisch mit einem kleinen Startplateau (Milochau et al., 1997).

den, wie *Eisenia fetida fetida*, ein Lektincharakter diskutiert werden kann, der in der agglutinierenden Aktivität und Zuckerspezifität einzelner Cölomflüssigkeitsfraktionen deutlich wird (Mohrig et al., 1996), ist eine Verbindung von Eiseniapore (38 kDa) und der opsonierenden Aktivität (38 kDa) möglich. Der Wirkmechanismus einer von uns diskutierten Wirkung von Eiseniapore auf pathogene, mehrzellige Parasiten der Anneliden wäre durch eine opsonierende Aktivität, die für Lektine diskutiert wird, herleitbar.

Die inhibierende Wirkung von  $\alpha_1$ -saurem Glykoprotein, Mucin, Glykophorin, Fetuin, der Blutgruppensubstanz A und Thyroglobin auf die lytische Aktivität von Eiseniapore stimmt mit der inhibierenden Wirkung dieser Kohlenhydratstrukturen auf das lytische Vermögen von Komponenten aus der Cölomflüssigkeit überein (Mohrig et al., 1996). Die inhibierende Wirkung der erwähnten Kohlenhydratstrukturen läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß Eiseniapore die Fähigkeit besitzt, mit einer Neu5Ac  $\alpha$  (2 3)/ $\alpha$  (2 6)-Gal Sequenz als einem möglichen Rezeptor auf den Membranen von entarteten Zellen oder pathogenen Bakterien wechselzuwirken (Mercy und Ravindranath, 1993; Tsuboi et al., 1993a,b; Ray und Chatterjee, 1995). Weitere Versuche sind allerdings nötig, um die Wechselwirkung zwischen Eiseniapore und Kohlenhydratstrukturen detailliert zu analysieren.

Da hämolytisch aktive Lektine erst seit wenigen Jahren untersucht werden - die lytisch und agglutinierend wirksamen Lektine aus der Cölomflüssigkeit von Anneliden waren die ersten, für die solche Aktivitäten überhaupt nachgewiesen werden konnten (Eue et al., 1991) - befindet sich die Analyse der Wechselwirkung dieser speziellen Lektine mit Kohlenhydratstrukturen erst am Anfang. Neben Eiseniapore wurde erst ein weiteres oligomerisierendes hämolytisches Lektin beschrieben: CEL-III aus *Cucumaria echinata* (Hatakeyama et al., 1996). Auch dieses Lektin wirkt über eine Hexamerbildung vermutlich in Form eines Membrankanals lytisch<sup>38</sup>.

Das zur Oligomerisierung befähigte Eiseniapore benötigt mindestens zwei Bindungsstellen:

- eine für die Interaktion mit der Targetmembran und
- eine weitere für die Vermittlung der Monomere zum Hexamer untereinander.

Eue (1991) konnte an der lytischen Aktivität der Cölomflüssigkeit nachweisen, daß verschiedene Inhibitoren der lytischen Komponenten an jeweils unterschiedlichen Bindungsstellen (lytisches Molekül Membran, lytisches Molekül lytisches Molekül) wechselwirken. Fetuin verhindert beispielsweise die Bindung von lytischen Komponenten aus der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* an der Erythrozytenmembran. Hingegen bleibt in Gegenwart von *Lumbricus terrestris* Cölomflüssigkeit, die die lytische Aktivität der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* unterdrückt (Henniger, 1990), die Bindungsfähigkeit der lytischen Moleküle von *Eisenia fetida fetida* trotz inhibierter lytischer Aktivität erhalten (Eue, 1991). Eue erklärt dies damit, daß Fetuin die Bindungsstelle zum Rezeptor blockiert, während Komponenten aus der *Lumbricus terrestris* Cölomflüssigkeit direkt auf das lytische Zentrum der Moleküle aus der Cölomflüssig-

---

<sup>38</sup> Es wird derzeit diskutiert, inwieweit die Hämolysine von *Limulus polyphemus* weitere Kandidaten für porenbildende Lektine sind (Armstrong et al., 1996).

keit von *Eisenia fetida fetida* wirken, ohne daß die Rezeptionsfähigkeit beeinflußt wird. Durch die direkte Bindung an die lytischen Moleküle soll die für den Lysevorgang notwendige Bildung eines hochmolekularen Komplexes verhindert werden (Eue, 1991).

Die inhibierende Wirkung von Kohlenhydratstrukturen ist aber auch mit einer katalytischen Wirkung auf die lytischen Proteine erklärbar. Die Interaktionen der Bindungsstellen, die eine Oligomerisierung der Eiseniapore-Monomere (Eiseniapore Eiseniapore) ermöglichen, kann durch die Anwesenheit von bestimmten Kohlenhydraten gefördert werden. Das hämolytische Lektin CEL-III oligomerisiert beispielsweise in Anwesenheit von Kohlenhydraten auch in Abwesenheit der Targetmembranen (Hatakeyama et al., 1996). Für die transmembranalen Poren des Komplements wurde eine katalytische Wirkung von  $\text{Zn}^{2+}$  auf die Oligomerisierung der lytischen Komplementmonomere beschrieben (Tschopp und Nabholz, 1990).

Für die lytischen und agglutinierenden Komponenten der Cölomflüssigkeit wurde N-Acetyl-Neuraminsäure als Rezeptor in der Targetmembran diskutiert (Mohrig et al., 1996); für Eiseniapore konnten wir jedoch die Wirkung von N-Acetyl-Neuraminsäure als ein Rezeptor nicht bestätigen. Komplexe Kohlenhydratstrukturen könnten die Bindung von Eiseniapore mit den Lipid-Rezeptoren (Sphingolipide) beeinflussen, ohne selbst ein Rezeptor zu sein. Dies wird durch folgende experimentelle Daten unterstützt: (i) der Einbau von Gangliosiden in Liposomen führt zu keinem erhöhten Leakage und (ii) Neuraminidase-behandelte Erythrozyten werden mit dem gleichen Titer lysiert wie unbehandelte Erythrozyten.

### 5.10. Eiseniapore - das erste nachgewiesene $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige lytische Lektin

Die von uns durchgeführten Zuckerinhibierungsversuche können als zusätzlicher Beleg für die Argumentation von Eue (1991) und Mohrig et al. (1996) über den Lektincharakter der agglutinierenden und lytischen Komponenten in Lumbriciden (Anneliden) bewertet werden. Insbesondere die vor kurzem erstmals nachgewiesene Kreuzreaktivität von lytischen und agglutinierenden Proteinen scheint ein deutliches Indiz hierfür zu sein, da eine agglutinierende Aktivität oft als charakteristisch für Lektine angesehen wird (Mohrig et al., 1996). Lektine der Vertebraten können in C- und S-Typen unterteilt werden (Drickhammer und Tayler, 1993)<sup>39</sup>. Den im Serum, der extrazellulären Matrix und in Membranen nachgewiesenen C-Typ Lektinen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit ihrer Kohlehydrat-Interaktion gemeinsam. Die gewöhnlich intrazellulär vorkommenden Galaktose-spezifischen S-Typ Lektine binden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an  $\beta$ -Galaktoside. Viele dieser können in ihrer Aktivität durch die Gegenwart von Thiol-Gruppen stabilisiert werden.

Einige wenige Lektine, wie die Pentraxine, das C-reaktive Protein oder die Mannose-spezifischen Lektine lassen sich in die obige dichotome Ordnung schwer einfügen. Wollte man für Eiseniapore keine eigene Ordnung - mit Eiseniapore als einzigem Vertreter - festlegen, könnte es wohl am ehesten als Lektin des S-Typs aufgefaßt werden. Insbesondere die Unabhängigkeit der lytischen Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ , die es von den Pentraxinen, den C-Typ Lektinen, aber auch von den bisher nachgewiesenen anderen hämolytischen Lektinen der Invertebraten (Hatakeyama et al., 1996, Armstrong et al., 1996) unterscheidet, lassen eine Zuordnung in diese Gruppe möglich erscheinen; auch wenn Wechselwirkungen mit niedermolekularen Kohlenhydraten nicht beobachtet werden konnten. Vor allem die bei S-Typ Lektinen speziell vorkommende Thiolabhängigkeit für die maximale Aktivität rechtfertigt diese Zuordnung. Die nicht nachzuweisende Supprimierung der lytischen Aktivität von Eiseniapore durch Neuraminsäure zum einen und die Inhibierung durch Fetuin zum anderen lassen insgesamt, wie auch die Versuche mit nicht-lytischen Lektinen von *Tachypleus tridentatus* und *Scylla serrata* zeigen, die Vermutung zu, daß freie Sialinsäuren oder Sialinsäure-haltige Oligosaccharide bei vielen Invertebraten-Lektinen keine Bindungsinteraktionen ermöglichen. Dazu bedarf es der komplexeren Strukturen der Sialoglykoproteine (Tsuboi et al., 1993).

Eiseniapore besitzt somit mindestens zwei nachgewiesene Aktivitäten, eine, die im Zusammenhang mit der (i) humoralen Abwehr (Zytolyse) und eine andere, die mit der (ii) zellulären Abwehr (Agglutination) diskutiert werden kann<sup>40</sup>. Eiseniapore wäre somit der erste, nachgewie-

---

<sup>39</sup> Um eine möglichst widerspruchsfreie Einordnung der einzelnen Lektine in das System zu ermöglichen, werden immer weitere Gruppen eingeführt (Vasta, 1997); die Einteilung der Lektine in hauptsächlich zwei Gruppen folgt einer traditionellen Klassifikation.

<sup>40</sup> Die Agglutination ist nicht *per se* ein Teil der zellulären Abwehr; Sinkora et al. (1993) diskutiert sie über ihre Funktion. Agglutinine bereiten Partikel und zelluläre Bestandteile für



sene Kandidat für die Hypothese (Sinkora et al., 1993) von der Kooperation humoraler und zellulärer Abwehr in Invertebraten.

### ***5.11. Die hämolytische Aktivität von Eiseniapore wird durch einen Regulator inhibiert***

Über regulierende und inhibierende Strukturen in der Gruppe der Invertebraten liegen bisher erst wenige Daten vor, ein eigentlicher Regulator konnte bis vor Beginn dieser Untersuchung nicht charakterisiert oder isoliert werden. Ähnlich wie bei dem Komplementsystem vermutete man eine Regulierung über biologische Halbwertszeiten der lytischen Proteine. Frei gelöst besitzt beispielsweise der naszierende C5b67-Komplex des Komplementsystems eine Halbwertszeit von 0.1 Sekunden, die Komplementkomponente C3b muß sogar innerhalb von 60 Mikrosekunden an ein Membranmolekül gebunden sein, sonst wird dieses Protein inaktiviert (Alberts et al., 1990). Für Hämolysine der Invertebraten ist ein ähnlicher Mechanismus diskutiert worden (Porchet-Hennere et al., 1992). Außerdem ist von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Hämolysinen ausgehend, eine regulatorische Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  vermutet worden (Canicatti, 1990). Wie bei den Vertebraten wäre auch bei den Invertebraten eine Regulierung der lytischen Substanzen als Inhibierung denkbar, da die Mehrzahl der lytischen Proteine äußerst reaktiv ist und eine Stimulierung somit nicht nötig ist. Canicatti (1990) betonte jedoch, daß die wenigen vorliegenden, experimentellen Daten leider keinerlei Hypothese über die Regulation der Hämolysine oder der Autolysis bei Invertebraten gestatten.

Die hämolytische Aktivität der Cöloflüssigkeit, lytischer Komponenten oder von gereinigten Proteinen kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Diese Methoden können in Festphasen- und Flüssigphasenassays unterteilt werden. Ein Festphasenassay ist der Hämolys-Plaques-Test, bei dem die Erythrozyten in flüssiger Agarose suspendiert und anschließend in Petrischalen ausgegossen werden. Nach Erstarrung des Erythrozyten/Agarose-Gemisches wird die zu testende Substanz auf dieses Agarosegemisch gegeben. Anschließend wird der Durchmesser der transparenten Höfen lysierter Erythrozyten als Maß der hämolytischen Aktivität bestimmt. Im Gegensatz dazu ist der Hämolys-Titrations-Test ein Flüssigphasenassay, sämtliche Komponenten liegen in einem Puffergemisch gelöst vor. Die in einer ansteigenden Verdünnungsreihe bestimmte Menge des Hämolysins, die notwendig ist, um noch eine 50%-ige Lyse der Erythrozyten zu erreichen, gilt als Hämolys-Titer.

Wird die hämolytische Aktivität der Cöloflüssigkeit von *Lumbricus terrestris* und *Eisenia fetida fetida* mit einem Festphasenassay (Hämolys-Plaques-Test) bestimmt, ist eine ähnliche lytische Aktivität der beiden Cöloflüssigkeiten nachzuweisen. Bei Bestimmung der lytischen Aktivität mit einem Flüssigphasenassay (Titrations-Test) zeigt sich jedoch eine deutliche Differenz zwischen den Cöloflüssigkeiten der beiden Arten (Mohrig et al., 1997). Wir haben vermutet, daß eine inhibierende Struktur in der Cöloflüssigkeit vorhanden ist, die in der

---

einen Aktivität der zellulären Abwehr auf.

Agarose durch die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Komponenten - lytische und inhibierende - voneinander getrennt werden und so zu keiner Unterdrückung der lytischen Faktoren führen. Im Flüssigphasenassay hingegen wird dieser Inhibitor nicht von den lytischen Komponenten abgetrennt, so daß unterschiedliche Hämolyse-Titer, je nach Konzentration des Inhibitors in der betreffenden Annelidenart, der Cölomflüssigkeiten zu beobachten sind.

Der Mangel an experimentellen Daten gestattete nur ein unzureichendes Bild über die Regulierung dieser Hämolyse; im Gegensatz zu den lytischen Proteinen der Vertebraten wie Perforin und Komplement, bei denen eine Regulierung und Inhibierung der Autolysis durch Vitronectin/S-Protein angenommen wird (referiert bei Canicatti, 1990 und Podack et al., 1991). So wurde auch für die lytischen Proteine der Invertebraten eine ähnliche chemische Struktur postuliert, die in einem regulatorischen Mechanismus eine Rolle spielt (Tschopp und Nabholz, 1990). In dem Schwamm *Microciona prolifera* konnte bereits einige Jahre vorher, als die Regulatorfunktion des multifunktionalen Proteins Vitronectin noch unbekannt war, ein Strukturprotein mit einer funktionalen Ähnlichkeit zu Vitronectin nachgewiesen werden, eine immunologische und strukturelle Verwandtschaft wurde jedoch ausgeschlossen, da dieses Protein nicht mit anti-Vitronectin Antiseren reagierte (Varner et al., 1988). In Invertebraten wurden 1992 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Vitronectin-ähnliche Substanzen mit anti-Vitronectin Antiseren nachgewiesen (Nakashima et al., 1992, Ehlers und Lange, 1992). Mit der für humanes Vitronectin genutzten Trennmethode der Glasperlen- und Heparin-Säulenchromatographie wurde deshalb die Cölomflüssigkeit von Lumbriciden fraktioniert. Die Isolierung des Proteins bis zur Homogenität aus der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* gelang erst mit der Elutions-Elektrophorese. Das gereinigte 67-kDa Protein zeigt eine regulierende Wirkung der lytischen Aktivität Eiseniapores, wir nannten es deshalb den Eiseniapore-regulierenden Faktor (ERF). Er ist in seiner Wirkung nicht von  $\text{Ca}^{2+}$ - und/oder  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig, verliert aber nach Inkubation mit Ethanol, KSCN oder NaSCN beziehungsweise mit KCl oder NaCl einen Teil seiner Aktivität.

Das humane Vitronectin besitzt einen Heparin-Bindungsort, der mit den cysteinreichen Bereichen von C9-Monomeren wechselwirkt. Die cysteinreichen Domänen ermöglichen die Oligomerisierung der Monomere zu einer transmembranalen Pore. Bei Maskierung dieser Domänen der Monomere durch Vitronectin ist die Assemblierung von C9-Molekülen nicht mehr möglich. Für den Eiseniapore-regulierenden Faktor konnte ein Heparin-Bindungsort nachgewiesen werden. Wird dieser mit Heparin blockiert, verliert der ERF seine inhibitorische Wirkung.

Die in Anneliden regulierenden Proteine sind, wie enzymimmunologische Verfahren zeigten, durch antigenes Material (Säuger-Erythrozyten) stimulierbar (Ehlers und Lange, 1992). Dies könnte damit erklärt werden, daß der ERF ohne antigene Strukturen auf einem niedrigen Level im Cölomraum zirkuliert. Gelangt invasives Material in das Cölom, erhöht sich die hämolytische Aktivität der Cölomflüssigkeit (Mohrig et al., 1997), dies kann mit einer Stimulierung der lytischen Proteine erklärt werden. Durch die höhere lytische Aktivität im Cölomraum ist auch ein erhöhter Schutz vor der Autolyse erforderlich.

Bei Vertebraten wird der Schutz vor der Auto- oder Selbstlyse durch membranständige und lösliche Faktoren gewährleistet. Ein membranständiger Faktor, der Zellen vor dem Komplementsystem schützt, ist der "homologe Restriktions-Faktor" (HRF) (Zalman et al., 1986; Hänsch,

1988; Zalmann und Müller-Eberhardt, 1994; Hayashi et al., 1996; Koike et al., 1996; Kawano et al., 1997). Vitronectin hingegen zirkuliert frei im Plasma (Peake et al., 1996; Su, 1996; Zhuang et al., 1996; Seiffert, 1997).

Unsere Ergebnisse lassen auf ähnliche Verhältnisse (membranständiger Schutz und frei zirkulierender Schutzmechanismus) bei den Lumbriciden schließen. Die Abwesenheit von Sphingolipiden in den das Cölom passierenden Nervenbahnen kann als membranständiger Schutz angesehen werden, wohingegen ein frei zirkulierender Schutzmechanismus vor den körpereigenen lytischen Proteinen durch den Eiseniapore-regulierenden Faktor gewährleistet werden kann.

Die immunologische Nähe ergibt sich aber vor allem auch aus der demonstrierten Austauschbarkeit der Regulatorproteine aus Invertebraten und Vertebratenbereich. Aus Säugern isoliertes Vitronectin hemmt die Komplement-vermittelte Lyse von Erythrozyten fast vollständig. Das gleiche Protein unterdrückt jedoch auch die Eiseniapore-induzierte Hämolyse. Vitronectin war nicht der erste Inhibitor der Komplementlyse, der im Invertebratenbereich getestet wurde. Die bisher untersuchten Inhibitoren (Hydrazin, Zymosan und Methylamin), zeigen keine Wirkung auf die Hämolyse (Söderhall, 1982; Roch et al., 1989; Armstrong et al., 1993). Die verwandten Inhibitoren inaktivieren Komplement durch die Wirkung auf dessen Schlüsselkomponente C3. Auch wenn über eine C3 Komponente in Invertebraten spekuliert werden kann, wird in der hier vorgelegten Untersuchung die Auffassung vertreten, daß die in höheren Vertebraten charakteristische Kaskade von C3 über C4, gefolgt von den terminalen Komponenten C5 bis C9, in Invertebraten nicht zu erwarten ist. Da man gegenwärtig von folgender phylogentischer Entwicklung des Komplementsystems ausgeht: Durch Genduplikation und anschließende Mutationen entstand aus dem genetischen Material des Perforins das Protein C9. Aus diesem evolvierten dann die anderen terminalen Proteine des Komplements, zuerst C8, aus dem sich dann C7, gefolgt von C6, entwickelten; dieser Komplex könnte sich dann in ein bereits vorhandenes primitives Komplementsystem, welches bis dahin der Opsonierung von Mikroorganismen diene, eingegliedert haben (Podack et al., 1991; Baish et al., 1997). So besitzt *Ginglymostoma serratum* (Ammenhai) im terminalen Bereich seines Komplementsystems erst die Komponenten C8 und C9, alle anderen fehlen, sie wurden erst phylogentisch später entwickelt (Fuji und Murakawa, 1981; Banner und Smith, 1997.).

Aus den dargelegten stammesgeschichtlichen Gründen erwarten wir nicht, daß Inhibitoren, die C3 beeinflussen, die hämolytische Aktivität in Invertebraten inhibieren. Für den Inhibitor von C9 und Perforin (Vitronectin) hingegen konnte eine Beeinflussung des Invertebraten-Hämolyse-Eiseniapore gezeigt werden. In Analogie zu diesen Experimenten wurde der Eiseniapore-regulierende Faktor auf seine Wirkung auf die Komplement-vermittelte Lyse von Erythrozyten getestet. Es konnte eine inhibierende Wirkung auf die Komplementlyse gezeigt werden. Der Inhibitor des lytischen Proteins aus Oligochaeten ist mit dem Inhibitor der Komplement-vermittelten Lyse der Säuger funktional austauschbar.

### ***5.12. Eiseniapore und dessen Regulator (ERF) sind immunologisch verwandt mit der Komplementkomponente C9 und dessen Regulator Vitronectin***

Von verschiedenen Autoren wird kreuzreagierendes Verhalten als erster Hinweis auf eine Aminosäuresequenzverwandtschaft interpretiert (referiert bei Ojcius und Young, 1991). Bei porenformenden Proteinen ist nach dem Nachweis der Kreuzreaktivität eine solche Verwandtschaft auch gezeigt worden: Polyklonale Antikörper gegen die porenformenden Proteinen von *Actinobacillus pleuropneumoniae* kreuzreagieren mit Überständen von *Streptococcus suis*, *Pasteurella hemolytica* und *Escherichia coli*. In dann folgenden Untersuchungen fand man Sequenzhomologien bei diesen Proteinen zwischen *A. pleuropneumoniae* und *P. hemolytica* von 64% Homologie oder zwischen *A. pleuropneumoniae* und *E. coli* von 44% Homologie (Braun und Focareta, 1991).

Nachdem auf Grund von Kreuzreaktionen in der Gruppe der Thiol-aktivierbaren Porenformer wie - Listeriolysin O (*Listeria monocytogenes*), Pneumolysin (*Streptococcus pneumoniae*), Streptolysin (*S. pyogenes*) und Perfringolysin (*Clostridium perfringens*) - eine phylogentische Verwandtschaft vermutet wurde, konnte durch Sequenzanalyse zwischen diesen Proteinen 55% und 65% Homologie gezeigt werden.

Kreuzreaktivität ist aber nicht notwendiger Weise ein Hinweis auf eine Aminosäuresequenzverwandtschaft. Was erkennt ein kreuzreagierender Antikörper? Ein Antikörper erkennt die Form einer Struktur, nicht deren Inhalt. Gegenwärtig geht man davon aus, daß Elektronenwolken - auch von proteinfreien und somit aminosäurefreien Substanzen - durch Antikörper eher identifiziert werden als spezifische chemische Strukturen (Roitt, 1995). Somit kann ein Antikörper ein Antigen eher in seiner Gesamtheit als in seiner Zusammensetzung erkennen. Dies wird deutlich durch das Phänomen der Kreuzreaktivität belegt. Da gerade diese Argumentation widersprüchlich diskutiert wird (Braun und Focareta, 1991), soll der Beschreibung von Kreuzreaktionen an proteinfreien Substanzen an dieser Stelle größerer Raum eingeräumt werden. Ein gegen ein bestimmtes Antigen gebildeter Antikörper erkennt auch ein anderes Antigen; so kann beispielsweise durch Immunisierung mit dem Metaisomer von Aminobenzolsulfonat ein Antikörper gegen diese Substanz hergestellt werden. Wenn dieser Antikörper mit den Ortho- und Paraisomeren des Aminobenzolsulfonats, wie auch zusätzlich mit den Ortho-, Meta-, und Paraisomeren von Aminobenzolarsonat und Aminobenzolcarboxylat, die mit dem Antigen Aminobenzolsulfonat chemisch verwandt aber nicht identisch sind, in Reaktion gebracht wird, kommt es zu spezifischen Reaktionen und Kreuzreaktionen<sup>41</sup> - den planaren Carboxylatgruppe in Metastellung (Roitt

---

<sup>41</sup> Im einzelnen ergeben sich folgende Reaktionen:

- der gegen Aminobenzolsulfonat gebildete Antikörper reagiert am stärksten spezifisch mit den Sulfonatgruppen in Metastellung (die eine Tetraederstruktur besitzen) und

et al., 1995)..

Zu keinen Kreuzreaktionen kommt es, wenn der Antikörper mit Arsonat- und Caboxylatgruppen in Ortho- oder Parastellung inkubiert wird. Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll, daß die Gesamtkonfiguration des Antigens ebenso wichtig wie dessen chemische Zusammensetzung ist. Die Kreuzreaktivität von Eiseniapore und C9, sowie dem ERF und Vitronectin deutet somit nicht zwingend auf eine Homologie zwischen den kreuzreagierenden Proteinen<sup>42</sup>. Die für eine immunologische Kreuzreaktion erforderlichen gemeinsamen oder ähnlichen antigenen Determinanten belegen eine strukturelle oder partiell strukturelle Verwandtschaft. Eine immunologische Verwandtschaft schließt jedoch eine phylogentische Verwandtschaft nicht zwangsläufig ein. So kann aus der Kreuzreaktion von Eiseniapore mit C9 und von dem Eiseniapore-regulierendem Faktor mit Vitronectin/ S-Protein auf strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den Proteinen aus Invertebraten mit denen aus Vertebraten geschlossen werden.

Der Begriff der immunologischen Verwandtschaft ließe sich an den einer phylogentischen Verwandtschaft binden, wenn davon ausgegangen wird, daß in der Evolution auch Formen und Strukturen ("Strukturschablonen", Creighton, 1983) weitergegeben werden. Anfang der neunziger Jahre wurde vorgeschlagen, die großen porenbildenden Proteine auf eine immunologische Verwandtschaft zu untersuchen, da so Aussagen über die Strukturen möglich wären, die notwendig für die Bildung einer Pore sind (Ojcius und Young, 1990, 1991). Mit der gezeigten Kreuzreaktivität von Eiseniapore und C9 ist erstmals eine immunologische Verwandtschaft von einer Komplementkomponente mit einem lytischen Proteinen eines Invertebraten nachgewiesen worden. Es ist neben dem Toxin des Einzellers *Trypanosoma cruzi* das zweite nachgewiesene zu C9 immunologisch verwandte Toxin (Andrews et al., 1990).

Die Bestimmung des N-Terminus der Aminosäuresequenz von Eiseniapore gelang nicht, da dieser blockiert war. Deshalb wurden Peptidfragmente durch enzymatische Spaltung gebildet, um diese anschließend auf Sequenzhomologien zu untersuchen. Wir konnten größere Bereich von homologen Strukturen von Eiseniapore zu Hämoglobinen von *Lumbricus terrestris* nachweisen; größere Bereiche sind mit Sequenzen aus Globin C und eine Fraktion mit dem Globin AIII (beide *L. terrestris*) identisch. Ein kleinerer Abschnitt aus Eiseniapore ist identisch mit einem Sequenzbereich aus einer Serin-Carboxypeptidase (E.C. 3.4.16.5.), eine Ähnlichkeit besteht außerdem zu einer Lipoxygenase (E.C. 1.13.11.12) aus Chloroplasten. Wichtig wird der Befund der Homologie zu *Lumbricus terrestris* Hämoglobinen durch ein interessantes Resultat von Suzuki und Riggs (1993). Sie fanden in der Struktur von Genen und Proteinen der L1-Kette des *Lumbricus-*

- 
- geringer mit der Sulfonatgruppe in Orthostellung und am schwächsten, wenn sich die Sulfonatgruppe in Parastellung befindet,
  - der gleiche Antikörper reagiert mit dem chemischen verwandten (= kreuzreagiert): der tetraedischen Arsonatgruppe in Metastellung und

<sup>42</sup> Zum Teil wird Begriff "immunologischen Homologie" für kreuzreagierende Proteine verwandt. "Homologie" ist allerdings schon zwischen Proteinen nicht einheitlich definiert.

Hämoglobins eine Homologie zum low-density-lipoprotein-(LDL)-Rezeptor und vermuten deshalb einen evolutionären Zusammenhang von Lumbricus-Hämoglobin und der terminalen humanen Komplementkomponente C9, einem Mitglied der Perforin-Familie. Die humane C9-Komponente und der LDL-Rezeptor sollen durch die Neukombination von Exons ("exon shuffling") - als Neukombination von funktionalen "Modulen" der Proteine - in der molekularen Evolution entstanden sein, sie gelten daher als phylogentisch verwandt (Urich, 1990). Unterstützt wird eine solche Überlegung durch eine Ähnlichkeit von 70 % einer größeren Fraktion aus Eiseniapore (Lys-Glu-Ile-Pro-Glu-Val-Ala-Asp-Leu-Phe) mit dem Protein C9 (Lys-Tyr-Ile-Pro-Glu-Ile-Ala-Glu-Leu-Tyr; Aminosäureposition: 459 - 468)<sup>43</sup>. Auch wenn dieser Grad der Übereinstimmung noch nicht als homolog gelten kann, gibt er neben dem bestehenden Nachweis der Kreuzreaktivität (siehe *Ergebnisse*, Kap. 4.18. und 4.19.) einen weiteren Hinweis auf eine immunologische Verwandtschaft, insbesondere da auch schon innerhalb der Säuger Übereinstimmungen von Vertretern der Perforin-Familie nur gering ausgeprägt sind (Komiya et al., 1997). Insgesamt erscheint es lohnend, die begonnen Arbeiten zur Sequenzanalyse Eiseniapores fortzuführen.

Die Resultate einer immunologischen Verwandtschaft von Eiseniapore und C9 führen zu wichtigen Implikationen über das Verständnis der Immunantwort von Anneliden. Ciliaten, Gregarinen (überwiegend Fam. Monocystidae), Cestoden und Nematoden, die typischen Parasiten der Anneliden, besitzen, wie bereits oben erwähnt, als typischen Bestandteil ihrer Lipidkomposition Sphingolipide (Kaneshiro, 1987; Maloney und Semprevivo, 1991; Nishimura et al., 1991; Satouchi et al., 1993; Chitwood et al., 1995). Dieses Lipide können sowohl für C9 als auch für Perforin als Rezeptor fungieren. Die Mitglieder der Perforin-Familie weisen neben der lytischen Aktivität auch noch eine chemotaktische Wirkung aus. Eine solche Aktivität kann auf Grund der strukturellen Verwandtschaft auch für Eiseniapore diskutiert werden. In den Cölomraum eindringende einzellige Parasiten könnten somit direkt durch transmembranale Eiseniapore-Kanäle zerstört werden. Auf mehrzellige Parasiten könnte sich der von Eiseniapore gebildete Kanal ebenfalls integrieren, aber dort, wie auch für die Mitglieder der Perforin-Familie beschrieben, eine chemotaxische Wirkung entfalten, die dann zelluläre Bestandteile des Abwehrsystems der Anneliden anlockt, um mehrzellige Parasiten einzukapseln und abzutöten.

Ein zusätzliches Indiz für eine solche Überlegung ist die Analogie von Wirkungen, die sowohl einzelne Mitglieder der Perforin-Familie als auch das vor kurzem isolierte Lysenin<sup>44</sup>

---

<sup>43</sup> Die sich erst in der Anfangsphase befindlichen Sequenzanalyse gestattet erst begrenzte Aussagen. Bemerkenswert ist, daß das Peptidfragment Eiseniapores die Ähnlichkeit zu C9 in dem Bereich der Aminosäureposition aufweist, der für die physiologische und hämolytische Wirkung von C9 mitverantwortlich ist.

<sup>44</sup> Lysenin besitzt eine hämolytische Aktivität, die die Anwesenheit von Sphingomyelin benötigen könnte (Sekizawa, persönliche Mitteilung). Das Molekulargewicht wird von Sekizawa et al. (1996, 1997) 33 kDa angegeben. Dieses Gewicht wurde mittels Säulen-Chromatographie bestimmt, bei einer Bestimmung mit der SDS-PAGE besitzt das gleiche Protein ein Molekulargewicht von 33 kDa.

(Sekizawa, 1997) aus der Cölofluid von *Eisenia fetida* ssp. initiiert. Ein wichtiger biologischer Effekt der Mitglieder der Perforin-Familie ist die Fähigkeit, eine Kontraktion glatter Muskel herbeizuführen. Lysenin besitzt die gleiche Eigenschaft, noch bei sehr geringer Konzentration ( $\sim 10^{-8}$  M) induziert es deutliche Muskelkontraktion.

### **5.13. Zusammenfassende Betrachtung der eigenen Ergebnisse an Hand lytischer Proteine aus den diskutierten Arten des Taxons *Eisenia fetida***

Das nach dem dänischen Physiologen benannte "A.-Krogh-Prinzip" besagt, daß es für jedes Problem eine Tierart gibt, an der es besonders gut studiert werden kann. Es ist bereits in der *Einleitung* begründet worden, warum es sinnvoll ist, an der Art *Eisenia fetida* ssp. die Aktivität von lytischen Proteinen in Anneliden zu studieren.

Das Vorhandensein eben dieser Art *Eisenia fetida* ist jedoch von Taxonomen mehrfach bezweifelt worden. Zwei sich widersprechende Thesen werden vertreten; *Eisenia fetida* ist ein Kosmopolit und somit eine weltweit nachzuweisende Art mit entsprechenden Variationen, oder *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ist nicht uniform, es sind zwei Arten (oder Unterarten): Omodeo (1952) fand zwei morphologische Varianten von *Eisenia fetida* (Sav.), die unterschiedliche Zelltypen und -größen aufwiesen. André (1963) beschrieb darauf aufbauend, zwei Farbvarianten *Eisenia fetida typica* (André 1963) und *Eisenia fetida unicolor* (André 1963), die sich untereinander nicht fortpflanzen, da sie sterile Hybriden produzieren. Da Hybridsterilität zahlreiche Grenzfälle einschließt, genügt es heute als einziges Kriterium für eine Art jedoch nicht mehr (Futuyma, 1990). Die Typen von André (1963) wurden durch Bouché (1972) revidiert: *Eisenia fetida typica* (André 1963) in *Eisenia fetida fetida* (Bouché 1972) und *Eisenia fetida unicolor* (André 1963) in *Eisenia fetida andrei* (Bouché 1972). Jaenike (1982) hat in Auswertung der Ergebnisse von André (1963) und Bouché (1972) gefolgert, daß die Unterarten als eigene Arten aufzufassen sind. Er schlug folgende Benennung vor: *Eisenia fetida* (Savigny 1826) für *Eisenia fetida andrei* (Bouché 1972) und *Eisenia unicolor* (André 1963) für *Eisenia fetida fetida* (Bouché 1972). Diese Bezeichnung hat sich nicht durchgesetzt. Ein Grund dafür könnte sein, daß *Eisenia fetida* (Savigny 1826) einmal die Bezeichnung der Erstbeschreibung sein kann oder aber die Benennung für die als Art aufgewertete Unterart *Eisenia fetida andrei* (Bouché 1972) (= *Eisenia fetida typica* (André 1963)).

Da Geschwisterarten, die morphologisch kaum zu unterscheiden sind, deutlich unterschiedliche physiologische/immunologische Eigenschaften besitzen können, erlangte die Frage, ob *Eisenia fetida* eine uniforme Art oder mehrere Arten sind, größere Relevanz, da die kommerziell vertriebenen *Eisenia fetida* für viele toxikologische und biochemische Studien Bedeutung besitzen; die Resistenz von *Eisenia fetida* gegen toxikologisch wirksame Substanzen hängt stark von physiologischen/immunologischen Charakteristika ab (Furst et al., 1993; Ville et al., 1995). Außerdem sind in den letzten Jahren mehrfach widersprüchliche Ergebnisse zu hämolytischen, hämagglutinierenden und antibakteriellen Faktoren gewonnen worden, so daß es sinnvoll ist, sich der Frage zuzuwenden, ob *Eisenia foetida* taxonomisch eine einheitliche Gruppe darstellt.

Die elektrophoretische Analyse der Esterasen von *Eisenia fetida* zeigten erstmals auch physiologische Unterschiede der Varianten und unterstützte so die These der möglichen zwei Arten (Oien und Stenersen, 1984). Bisher fehlten weitere Analysen von physiologischen/immunologischen Unterschieden der Varianten. Da die lytischen Proteine aus diesen



möglichen beiden Arten<sup>45</sup> isoliert vorliegen, können sie verglichen werden: Eiseniapore aus *Eisenia fetida fetida* und die Fetidine aus *Eisenia fetida andrei*. Wie in der *Einleitung* bereits dargelegt, können Eiseniapore und Fetidine auch unterschiedliche Proteine in ein und derselben Art sein; beziehungsweise könnte Eiseniapore und die Fetidine auch in der jeweils anderen Species vorkommen. Im folgenden soll deshalb der Schwerpunkt auf dem Vergleich der unterschiedlichen lytischen Moleküle liegen.

Beide Proteine sind in der Lage, Säuger-Erythrozyten zu lysieren. Für Eiseniapore konnte außerdem gezeigt werden, daß es befähigt ist, in Liposomen einen Leakage zu induzieren. Für Fetidine ist, wie auch für die Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida andrei*, eine bakteriostatische Wirkung gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen nachgewiesen worden (Milochau et al., 1997). Die Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* zeigt hingegen eine antibakterielle Aktivität gegen ein sehr kleines Spektrum an Mikroorganismen (Kauschke und Mohrig, 1987).

Eiseniapore reiht sich mit seiner Fähigkeit, makromolekulare Proteinporen in Targetmembranen zu integrieren, in die Gruppe der in der Evolution sehr erfolgreichen kanalbildenden Proteine ein. Die Fetidine können ebenfalls räumlich eng begrenzte, diskrete Läsionen in der Membran zu verursachen, jedoch fehlt ihnen die für Kanalbildner charakteristische Eigenschaft, die Läsion durch ringförmige Proteinporen zu induzieren und zu umschließen (Roch et al., 1989).

In ihrer lytischen Aktivität variieren die Fetidine zwischen 4°C und 45°C nicht (Roch et al., 1989), Eiseniapore hingegen ist in seiner lytischen Wirkung ein deutlich Temperatur-abhängiges Protein. Beiden lytischen Proteine ist gemeinsam, daß sie, im Gegensatz zu vielen beschriebenen Hämolytinen der Invertebraten, weder  $\text{Ca}^{2+}$  noch  $\text{Mg}^{2+}$  benötigen, um ihre maximale lytische Aktivität zu erreichen.

Deutliche Unterschiede zeigen sich in der Wirkung von Kohlenhydraten auf die lytische Aktivität der beiden Moleküle. Während Zucker, wie D-Glucose, Lactose und D-Galactose, Cellobiose die Aktivität der lytischen Proteine von *Eisenia fetida andrei* inhibieren (Roch et al., 1984), beeinflußt keiner der getesteten einfachen Zucker die lytische Aktivität Eiseniapores. Die Hemmung durch komplexe Zucker (N-Acetyl-D-Glucosamin, N-Acetyl-D-Galactosamin) ist für beide Moleküle nachzuweisen. Für lytische Fraktionen der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* ist die Wirkung von komplexen Kohlenhydratstrukturen (Fetuin,  $\alpha_1$ -saures Glucoprotein, Thyroglobulin) sehr detailliert analysiert worden; von diesen Untersuchungen ausgehend, ist vermutet worden, daß N-Acetyl-Neuraminsäure - beispielsweise in Form von Gangliosiden - der Rezeptor in der Targetmembran ist (Eue et al., 1991; Mohrig et al., 1996). Für die lytische Aktivität Eiseniapores konnten wir die Wirkung von Kohlenhydraten bestätigen und fanden im Zusammenhang mit der agglutinierenden Fähigkeit von Eiseniapore einen deutlichen Hinweis auf die Lektinstruktur dieses lytischen Proteins. Auch wenn für semi-gereinigte Hämolytine von *Eisenia fetida andrei* eine agglutinierende Aktivität demonstriert wurde (Roch et al., 1987),

---

<sup>45</sup> Da die taxonomische Benennung der Arten/Unterarten z.Z. unbefriedigend gelöst ist, werden für die bessere Darstellung ausschließlich die Bezeichnungen der Unterarten verwandt.

konnte diese Aktivität bei den Fetidinen nicht gezeigt werden, sie sind demnach keine Lektine oder Lektin-ähnliche Strukturen.

Wir fanden bei Versuchen mit Eiseniapore keine Bestätigung für die Vermutung, daß Neuraminsäuren allein oder die Ganglioside einen Rezeptor darstellen. Eine Rezeptorwirkung für Eiseniapore war nur für Sphingolipide wie Sphingomyelin und Galactosylceramid nachzuweisen. Wir können auch ausschließen, daß auf biologischen Membranen wie Erythrozyten Rezeptoren mit einer Kohlenhydrat- oder Proteinstruktur als zusätzlicher Rezeptor für Eiseniapore fungieren. Sphingolipide sind somit vermutlich obligat für lytische Aktivität Eiseniapores. Für die Fetidine sind Versuche mit Liposomen für die Analyse des Rezeptors angekündigt, die Durchführung steht jedoch aus, so daß für die Fetidine bisher kein Rezeptor nachgewiesen worden ist. Angereicherte, aber nicht gereinigte Hämolysine aus *Eisenia fetida andrei* lassen sich in ihrer Wirkung nicht durch Phosphorylcholinchlorid inhibieren. Die lytische Aktivität der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* ließ sich durch diese Substanz deutlich unterdrücken (Ehlers und Lange, 1992). In Versuchen mit der gereinigten lytischen Komponente Eiseniapore konnte die molekulare Struktur, auf die die Inhibierung mit Phosphorylcholinchlorid hindeutete, genauer aufgeklärt werden. Die von uns nachgewiesenen Eiseniapore-Rezeptoren Ceramidphosphocholin (= Sphingomyelin) und Galactosylceramid verweisen auf die essentielle Bedeutung hydrophiler Kopfgruppen wie Galactosyl oder Phosphorylcholin und auf die Notwendigkeit eines Ceramid-drückgrates. Für die zwei Fetidine aus *Eisenia fetida andrei* wurden ungefähr  $10^4$  Moleküle pro Erythrozyt errechnet, die nötig sind, um einen 50%-ige Lyse zu induzieren (Milochau et al., 1997). Ausgehend von Arbeiten mit Mellitin, einschließlich synthetischen Analoga und dem  $\delta$ -Hämolsin von *Staphylococcus aureus*, verwiesen die Autoren auf die Fähigkeit von Erythrozyten,  $10^7$  Toxinen pro Zelle zu binden. Diese Anzahl wurde von Milochau et al. (1997) mit der notwendig Anzahl von Toxinen, die benötigt wird, um eine Lyse einzuleiten, gleichgesetzt. Die Autoren werten die Differenz aus den maximal möglichen  $10^7$  und den realisierten  $10^4$  gebundenen Fetidinen als Hinweis auf einen Rezeptor. Wir halten jedoch die Gleichsetzung von Bindung mit Lyse für problematisch - Bindungsverhalten ist nicht kongruent mit Leakageverhalten.

Eiseniapore induziert mit  $10^5$  Molekülen pro Zelle eine 50%-ige Lyse von Schaferythrozyten, der Anteil der für die Lyse notwendigen Toxine liegt um eine Zehnerpotenz höher, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Differenz von Fetidinen und Eiseniapore auf unterschiedliche, experimentelle Verfahren zurückzuführen ist.

Die lytische Aktivität der Fetidine ist im Gegensatz zu der von Eiseniapore nicht durch Heparin inhibierbar, für das eine inhibierende Wirkung auf das lytische Vermögen von Komplement in vitro (Edens et al., 1994) und vivo (Weiler et al., 1992) gezeigt wurde, auch wenn Heparin nicht zu den natürlichen Inhibitoren gehört. Für beide lytische Proteine der Anneliden ist analysiert worden, ob natürliche Inhibitoren/Regulatoren anderer lytischer Proteine (Komplement und Perforin) auf sie wirken. So sind die Fetidine wie auch Eiseniapore in ihrer hämolytischen Wirkung in Gegenwart von Komplement-Inhibitoren untersucht worden. Entsprechend dem unterschiedlichen Grundverständnis der Arbeitsgruppen von einer möglichen immunologischen Verwandtschaft von Fetidinen mit der Schlüsselkomponente C3 und von Eiseniapore mit der

Komplementkomponente C9, wurden überwiegend C3-Inhibitoren in ihrer Wirkung auf Fetidine untersucht und C9-Inhibitoren für die Analyse der hämolytischen Aktivität verwandt. Lediglich Protamin, ein basisches Protein mit 30-70% Argininanteil, das die lytische Aktivität von C9 unterdrückt, wurde in seiner Wirkung auf die beiden Moleküle untersucht. Inhibitoren der C3 Komponente beeinflussen die hämolytische Aktivität der Fetidine nicht. Vitronectin, der Inhibitor von C9, unterdrückt die hämolytischen Fähigkeit von Eiseniapore hingegen deutlich. Beide lytischen Proteine sind mit Protamin inkubiert worden, dieses C9 inhibierende Protein unterdrückt nur die lytische Aktivität von Eiseniapore, die lytische Aktivität der Fetidine bleibt unbeeinflusst.

Mit der vorgelegten Arbeit wurde die bisher phylogentisch älteste Einheit von lytischen Protein und dessen Regulator beschrieben. In der Cölomflüssigkeit von *Eisenia fetida fetida* haben wir einen Eiseniapore-regulierenden Faktor identifiziert und charakterisiert. Er ist immunologisch verwandt mit Vitronectin und zeigt mit einem Heparin-bindungs Ort auch ein gleiches wichtiges chemisches Merkmal.

Während sich Eiseniapore, trotz ungewöhnlicher Eigenschaften, wie die erstmals für lytische Proteine beschriebene Thiol-Aktivierung, die mit einer Sphingomyelin-Inhibierung verbunden ist, in das System der assemblierenden, makromolekularen Proteinporen des Abwehrsystems einfügt, wird hingegen für Fetidine eine völlige Sonderstellung - auch in Bezug auf Hämolysine anderer Anneliden - angenommen. Diese Stellung der Fetidine schließt einen phylogenetischen Zusammenhang zu anderen lytischen Proteinen aus (Valembois, persönliche Mitteilung). So finden sich neben den Gemeinsamkeiten von Eiseniapore und Fetidinen eine Vielzahl von Unterschieden.

Zwischen den Arbeitsgruppen bestanden und bestehen enge Kontakte; über viele Jahre ist versucht worden, aus der *Eisenia fetida fetida* (= *Eisenia unicolor*) genannten Species Fetidine (für das semi-gereinigte Protein vormals: EFAF (*Eisenia fetida andrei* factor) (Roch et al., 1981) zu isolieren. Da aber - wie dargelegt - das Ausgangsmaterial (die Cölomflüssigkeit) schon deutliche biochemische Unterschiede aufweis, gelang dies nicht. Im Gegenzug war es den französischen Gruppen bisher nicht möglich, ein Eiseniapore-ähnliches Molekül zu isolieren und zu charakterisieren. Dies schließt jedoch nicht aus, daß Fetidine und Eiseniapore in beiden Arten vorkommen.

Insbesondere für die geplanten toxikologischen Untersuchungen zum Ah-Rezeptor in *Eisenia fetida* ssp. und der Wechselwirkung ihres Abwehrsystems mit Dioxinen (Cooper, persönliche Mitteilung) sollte berücksichtigt werden, daß Tiere aus einheitlichen Zuchten entnommen werden. Denn neben den bereits identifizierten Unterschieden im dem Protein-Muster der Cölomflüssigkeit, vor allen aber wegen der Tatsache, daß die Individuen der beiden vermuteten Arten untereinander keine fortpfanzungsfähigen Nachkommen zeugen, könnten die Unterschiede von Komponenten des Abwehrsystems ein zusätzlicher Grund sein, von einem Taxon auszugehen, welches vermutlich keine homogene Gruppe darstellt.

Folgende weiterführenden Fragestellungen und Überlegungen ergeben sich aus den diskutierten Ergebnissen. Eiseniapore ist ein stark lytisch wirkendes porenformendes Protein. In der vorlegten Arbeit wurde dies für Liposomen und Erythrozyten gezeigt. Wie für den Membranangriffskomplex des Komplements und für Perforin ist auch für Eiseniapore die physiologische/immunologische Bedeutung nicht geklärt. Weiterführende Untersuchungen mit Bakterien und Parasiten sollten Auskunft über die Bedeutung Eiseniapores geben. Die Vorversuche zu der zytotoxischen Wirkung Eiseniapores auf Tumorzellen, lassen eine Fortführung der Experimente sinnvoll erscheinen. In Anlehnung an die Versuche von Song et al. 1996 und Russo et al., 1997 sollte versucht werden, Metallionen und Enzyme zu identifizieren, die die Pore gezielt öffnen und schließen.

Zur Strukturuntersuchung der Eiseniapores bietet sich die Elektronenmikroskopie an. Die Eiseinbettungstechnik der Kryoelektronenmikroskopie erhält dabei die native Struktur und könnte gegebenenfalls sogar verschiedene Funktionszustände des Proteins abbilden. Jüngere statistische und mathematische Methoden erlauben durch Bildmittelung und dreidimensionale Rekonstruktion eine Modellierung des oligomerisierten Proteins (Schatz und van Heel, 1990; Schatz et al., 1995). Das Verständnis über die Struktur Eiseniapores und seines Regulators würde durch eine Sequenzanalyse deutlich vertieft werden. Nachdem gezeigt wurde, daß Eiseniapore Sphingolipide für die Vermittlung des Leakage benötigt und das Ausmaß der Leakage durch die Anwesenheit von Cholesterol gesteigert werden kann, könnte durch Ceramide und Ceramidanaloga (siehe auch: Nieva et al., 1994; Corver et al., 1995; Moesby et al., 1995) die molekulare Struktur dieser Wechselwirkung von Sphinglipiden und Cholesterol näher beschrieben werden: Unter anderem, ob die 3-OH Gruppe und/oder die zweikettige Struktur des Ceramids für diesen Effekt verantwortlich ist (Slotte, 1996). Für die Membranwechselwirkung des Semliki-Forest-Virus, der Sphingolipide für das Fusionsereignis benötigt, konnte beispielsweise gezeigt werden, daß nur die D-*Erythro*-Isomere eine aktive Form darstellen.

Die gewonnenen Resultate und der Ausblick auf die weiteren Experimente zeigen, daß die Charakterisierung der Struktur Eiseniapores, der Membranwechselwirkung und der Regulation der lytischen Aktivität einen wesentlichen Beitrag für das bessere Verständnis der sogenannten makromolekularen Poren allgemein leisten kann; aber eine solche Analyse erweitert auch ganz speziell unser Wissen um die immunologische Abwehr einer phylogenetisch erfolgreichen und wichtigen taxonomischen Gruppe: "Earthworms have played a most important part in the history of the world." (Darwin, 1881).

# LITERATURVERZEICHNIS

- Abee, T. (1995) Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 1-10.
- Alberts, B., Dennis, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1990) Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Cambridge.
- Albro, P. W., Schroeder, J. L., and Corbett, J. T. (1992) Lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Lipids* **27**, 136-143.
- Albro, P. W., Corbett, J. T., and Schroeder, J. L. (1993) Endogenous lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochem. Cell. Biol.* **71**, 220-221.
- André, F. (1963) Contribution a l'analyse expérimentale de la reproduction des lombriciens. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **97**, 3-101.
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin S. L., and Griffiths G. (1990) A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* **61**, 1277-1287.
- Antia, R., Schlegel, R. A., and Williamson, P. (1992) Binding of perforin to membranes is sensitive to lipid spacing and not headgroup. *Immunol. Lett.* **32**, 153-157.
- Arbuthnott, J. P., Freer, J. H., and Billcliffe, B. (1973) Lipid-induced polymerization of Staphylococcal - toxin. *J. General Microbiol.* **75**, 309-319.
- Armstrong, P. B. and Quigley, J. P. (1987) Limulus alpha 2-macroglobulin. First evidence in an invertebrate for a protein containing an internal thiol ester bond. *Biochem. J.* **248**, 703-707
- Armstrong, P. B., Mangel W. F., Wall J. S., Hainfield, J. F., Van Holde K. E., Ikai, A., and Quigley J. P. (1991) Structure of alpha 2-macroglobulin from the arthropod *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.* **266**, 2526-2530.
- Armstrong, P. B., Armstrong, M. T., and Quigley, P. (1993) Involvement of alpha-macroglobulin and C-reactive protein in a complement-like hemolytic system in the arthropod, *Limulus polyphemus*. *Mol. Immunol.* **30**, 929-934.
- Armstrong, P. B., Swarnakar, S., Srimal, S., Misquith, S., Hahn, E. A., Aimes, R. T., Quigley, J. P. (1996) A cytolytic function for a sialic acid-binding lectin that is a member of the pentraxin family of proteins. *J.*

*Biol. Chem.* **271**, 14717-14721.

Arnold, F. H. and Zhang, J. H. (1994) Metal-mediated protein stabilization. *Trends Biotechnol.* **12**, 189-192.

Atkinson, E. A. and Bleackley, R.C. (1995) Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit. Rev. Immunol.* **15**, 359-384.

Baish, M. A., Lohr, R. L., and Bartl, S. (1997) Molecular evidence for complement and  $\alpha_2$ -macroglobulin family members in the colonial ascidian, *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 147.

Banner, M. and Smith, S. L. (1997) Isolation of a gene probe for shark (*Ginglymostoma cirratum*) C3 gene. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 148.

Barenholz, Y. (1984) Sphingomyelin-lecithin balance in membranes: composition, structure, and function relationships. In *Physiology of membrane fluidity*. Vol. **1** (Schinitzky, M., ed.), 131-174, CRC Press, Boca Raton, FL.

Barnes, D. W. and Silutzer, J. (1983) Isolation of human serum spreading factor. *J. Biol. Chem.* **58**, 12548-12552.

Becherer, D. J., Alsenz, J., and Lambris, J. D. (1990) Molecular aspects of C3 interactions and structural/funktion analysis of C3 from different species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **153**, 45-72.

Bennett, M. J., Schlunegger, M. P., and Eisenberg, D. (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Prot. Sci.* **4**, 2455-2468.

Berke, G. (1997) Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **4**, 32-40.

Bernheimer, A. W. and Rudy, B. (1986) Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* **864**, 123-141

Bernheimer, A.W. (1988) Assay of hemolytic toxins. *Meth. Enzym.* **165**, 213-217.

Bernheimer, A. W. (1996) Some aspects of the history of membrane-damaging toxins. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **185**(2), 59-63.

Bertheussen, K. (1982) Receptors for complement on echinoid phagocytes. II. Purified human complement mediates echinoid phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* **6**, 635-642

- Bertheussen, K. (1983) Complement - like activity in sea urchin coelomic fluid. *Dev. Comp. Immunol.* **1**, 21-31.
- Bertheussen, K. (1984) Complement and lysis in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **3**, 173-181.
- Bhakdi, S. and Trandum-Jensen, J. (1983) Membrane damage by channel-forming proteins. *Trends Biochem. Sci.* **306**, 134-136
- Bhakdi, S. and Trandum-Jensen, J. (1984) Mechanism of complement cytolysis on the concept of channel-forming proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **306**, 311-324
- Bhakdi, S. and Trandum-Jensen, J. (1985). Membrane damage by channel-forming proteins: staphylococcal alpha toxin, streptolysin-O and the C5b-9 complement complex. *Biochem. Soc. Symp.* **50**, 221-33.
- Bhakdi, S., Trandum-Jensen, J., and Sziegoleit, A. (1985) Mechanism of membrane damage by Streptolysin-O. *Infect. Immun.* **47**, 52-60.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M., and Holland, I. B. (1986) Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* **52**, 63-69.
- Bhakdi, S. and Traunum-Jensen, S. (1988) Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysis. *Prog. Allergy.* **40**, 1-43.
- Bhakdi, S. and Trandum-Jensen, J. (1991, a) Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiol. Rev.* **55**, 733-751.
- Bhakdi, S. and Trandum-Jensen, J. (1991, b) Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today* **12**:9 318-20; discussion 321.
- Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Weller, U., Kehoe, M., and Palmer, M. (1996) Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol.* **165**, 73-79.
- Bigger, C. H., Jokiel, P. L., Hildemann, W. H., Johnston, I. S. (1982) Characterization of alloimmune memory in a sponge. *J. Immunol.* **129**, 1570-1572.
- Bilej, M., Scheerlinck, J., VandenDriessche, T., De Baetselier, P., and Vetvicka, V. (1990) The flow

- cytometric analysis of in vitro phagocytic activity of earthworm coelomocytes (*Eisenia foetida*: Annelida). *Cell. Biol. Int. Rep.* **14**, 831-833.
- Bilej, M., De Baetselier, P., Trebichavsky, I., and Vetvicka, V. (1991) Phagocytosis of synthetic particles in earthworms: absence of oxidative burst and possible role of lytic enzymes. *Fol. Biol.*, **37**, 227-231.
- Bilej, M., Brys, L., Beschin, A., Lucas, R., Vercauteren, E., Hanusová, and de Baetselier, P. (1995) Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunol. Lett.* **45**, 123-128.
- Birmingham, D. J. (1995) Erythrocyte complement receptors. *Crit. Rev. Immunol.* **15**:2, 133-154.
- Bitter-Suermann und Hadding, U. (1991) Das Komplement. In *Immunologie* (Hrsg. Gemsa, D., Kalden, J., Resch, K.) Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Bittman, R. (1993) A review on the kinetics of cholesterol movement between donor and acceptor bilayer membranes. In *Cholesterol in model membranes* (Finegold, L. X., ed.) 45-65, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bittman, R., Kasireddy, C. R., Mattjus, P., and Slotte, J. P. (1994) Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. *Biochemistry* **33**, 11776-11781.
- Bizzini, B. (1979) Tetanus toxin. *Microbiol. Rev.* **43**, 224-240.
- Blanco, G. A., Escalada, A. M., Alvarez, E., and Hajos, S. (1997) LPS-induced stimulation of phagocytosis in the sipunculan worm *Themiste petricola*: possible involvement of human CD14, CD11B and CD11C cross-reactive molecules. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 349-362.
- Boman, H. G. (1991) Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell* **65**, 205-207.
- Bouché, M. B. (1972) Lombriciens de France. Ecologie et systematique. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **72**, 671.
- Boulnois, G. J. (1992) Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 249-259.
- Braun, V. and Focareta, T. (1991) Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 115-158.
- Brinkhurst, R. (1983) Comments on the evolution of the annelida. *Hydrobiologia* **109**, 189-191.



Brumback, R. A. (1981) The neuromuscular junction. Part I: physiology and the effects of drugs and toxins. *Am. Fam. Physician.* **23**, 188-192.

Buckley J. T., Wilmsen H. U., Lesieur C., Schulze A., Pattus F., Parker, M.W., and van der Goot F.G. (1995) Title Protonation of histidine-132 promotes oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin. *Biochemistry*, **34**, 16450-16455.

Bunting, M., Lorant, D. E., Bryant, A. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Stevens, D. L., and Prescott S. M. (1997) Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **100**:3, 565-574.

Burke, V., Robinson, J. O., Richardson, C. J., and Bundell, C. S. (1991) Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathology* **23**, 145-148.

Cai L., Chu Y., Wilson S. E., Schlender K. K. (1995) A metal-dependent form of protein phosphatase 2A. *Biochem Biophys Res Commun*, **208**, 274-279.

Cajal, Y. and Jain, M. K. (1997) Synergism between mellitin and phospholipase A2 from bee venom: apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. *Biochemistry* **36** 3882-3893.

Canicatti, C. (1987) Membrane damage by coelomic fluid from *Holothuria polii* (Echinodermata). *Experientia* **6**, 611-614.

Canicatti, C. and Ciulla, D. (1987) Studies on *Holothuria polii* (Echinodermata) coelomocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 705-715.

Canicatti, C. and Ciulla, D. (1988) Studies on *Holothuria polii* (Echinodermata) coelomocyte lysate. II. Isolation of coelomocyte hemolysins. *Dev. Comp. Immunol.* **12**, 55-63.

Canicatti, C., Parrinello, N., and Arizza, V. (1987) Inhibitory activity of sphingomyelin on hemolytic activity of coelomic fluid of *Holothuria polii* (Echinodermata). *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 29-35.

Canicatti, C. (1988) The lytic system of *Holothuria polii* (Echinodermata): a review. *Boll. Zool.* **3**, 139-144.

Canicatti, C. (1990). Hemolysins: pore-forming proteins in invertebrates. *Experientia* **3**, 239-244.

Canicatti, C. and Roch, P. (1993) Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of *Spirograhis spallanzani* coelomic fluid hemolysin. *Comp. Biochem. Physiol. C* **105**, 401-407

- Cerottini, J. C. and Tschopp, J. (1997) New knowledge about T-cell cytotoxicity. *Ann. Oncol.* **8**, 75-78.
- Chai, L., Chu, Y., Wilson, S. E., and Schlender, K. K. (1995) A metal-dependent form of protein phosphatase 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 274-279.
- Chitwood, D. J., Lusby, W. R., Thompson, M. J., Kochansky, J. P., and Howarth, O. W. (1995) The glycosylceramides of the nematode *Caenorhabditis elegans* contain an unusual, branched-chain sphingoid base. *Lipids* **30**, 567-573.
- Cifrian, E., Guidry, A. J., Bramley, A. J., Norcross, N. L., Bastida-Corcuera, F. D., and Marquardt, W. W. (1996) Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* **48**:3-4, 187-198.
- Clark, W. R., Walsh, C. M., Glass, A. A., Huang, M. T., Ahmed, R., Matloubian, M. (1995) Cell-mediated cytotoxicity in perforin-less mice. *Int. Rev. Immunol.* **13**, 1-14.
- Clinkenbeard, K., Mosier, D., and Confer, A. (1989) Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* **57**, 420-425.
- Clinkenbeard, K. and Upton, M. (1991) Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 453-457.
- Colten, H. R. and Rosen FS (1992) Complement deficiencies. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 809-834.
- Cooper, E. L., Stein, E. A. and Wojdani, A. (1984) Recognition receptors in Annelids. in: *Recognition proteins, receptors and probes: invertebrates*. ed. Cohen, E., 43-54.
- Cooper, E. L. and Roch, P. (1986) Second-set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Kinetics and characteristics. *Transplantation* **41**, 514-520.
- Cooper, E. L., Rinkevich, B., Uhlenbruck, G., and Valembois, P. (1992) Invertebrate immunity: another viewpoint. *Scand. J. Immunol.* **35**, 247-266.
- Cooper, E. L., Cossarizza, A., Suzuki, M. M., Salvioli, S., Capri, M., Quaglino, D., and Franceschi, C. (1995) Autogenic but not allogenic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor target K562. *Cell. Immunol.* **166**, 113-122.

- Coote, J. G. (1992) Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**, 137-161.
- Corver, J., Moesby, L., Erukulla, R. K., Reddy, K. C., Bittman R., and Wilschut J. (1995) Sphingolipid-dependent fusion of Semliki Forest virus with cholesterol-containing liposomes requires both the 3-hydroxyl group and the double bond of the sphingolipid backbone. *J. Virol.* **69**, 3220-3223.
- Cossarizza, A., Cooper, E. L., Suzuki, M. M., Salvioli, St., Capri, M., Gri, G., Quaglino, D., and Franceschi, C. (1996) Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp. Cell Res.* **224**, 174-182.
- Cotuk, A. and Dales, R. P. (1984) The Effect of the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* (Sav.) on certain bacteria on the role of the coelomocytes in internal defence. *Comp. Biochem. Physiol.* **78A**, 271-274.
- Cotuk, A., Dales, R. P. (1984) Lysozyme activity of the earthworm *Eisenia foetida* (Sav.) in relation to bacterial infection. *Comp. Biochem.* **78A**, 469-472.
- Cramer, W. A., Daukert, J. R., and Uratani, Y. (1983) The Membran channel-forming bacterial protein, colicin E1. *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 173-193.
- Creighton, T. (1983) Proteins. Freeman, San Francisco.
- Cruz, W., Young, R., Chang, Y., and Struck, D. (1990) Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the *Pasteurella* leukotoxin. *Mol. Microbiol.* **4**, 1933-1939.
- Cudd, A. (1989) Dextran protection of erythrocytes from low pH-induced hemolysis. *FEBS Lett* **250**, 293-296.
- Darwin, G. (1881) The formation of vegetable mould through the action of worms with some observations on their habits. London. [Die Bildung der Ackererde durch die Tätigkeit der Würmer, mit Beobachtungen über deren Lebensweise. übers. Carus, J. V. (1983) März-Verlag, Berlin]
- Datta, D. B. (1987) A comprehensive introduction to membrane biochemistry. Floral Publishing, Madison.
- Day, N. K. B., Gewurz, H., Johannsen, R., Finstad, J. and Good, R. A. (1970) Complement and complement-like activity in lower vertebrates and invertebrates. *J. Exp. Med.* **132**, 941-950.
- De Boeck, M. and Kirsch-Volders, M. (1997) *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate

sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of PAH exposure to the environment. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**, 82-90.

DiMari S. J., Cumming M. A., Hash J. H., and Robinson J. P. (1982) Purification of tetanus toxin and its peptide components by preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**, 342-353.

DiScipio, R. G. and Hugli, T. E. (1989) The molecular architecture of human complement component C6. *J Biol Chem.* **264**, 16197-16206.

Drickhammer, K. und Tayler, M. E. (1993) Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 237-264.

Du Pasquier, L. and Duprat, P. (1968) Humoral and cellular aspects of a non-specific natural immunity in the oligochetee *Eisenia foetida* Sav. (Lumbricinae) *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.* **266**, 538-541.

Du Pasquier, L. (1982) Antibody diversity in lower vertebrates. Why is it so restricted? *Nature* **296**, 311-313.

Du Pasquier, L. (1992). Origin and evolution of the vertebrate immune system. *APMIS* **5** (100), 383-392.

Eberspächer, B., Hugo, F., and Bhakdi, S. (1989) Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **57**, 983-988.

Edens, R. E., Linhardt, R. J., Bell, C. S., and Weiler, J. M. (1994) Heparin and derivatized heparin inhibit zymosan and cobra venom factor activation of complement in serum. *Immunopharm.* **27**, 145-153.

Edwards, C. A. and Lofty, J. R. (1972) Biology of earthworms. Chapman and Hall, London.

Ehlers, D. and Lange, S. (1992) Regulation of the activity of pore forming proteins of annelids and their phylogenetic relationship to cytolytic systems of mammals. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 765.

Ellens, H., Bentz, J. and Szoka, F. C. (1985) H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* **24**, 3099-3106.

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K. D. (1994) Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 814-825.

- Enghild, J. J., Thøgersen, I. B., Salvesen, G., Fey, G. H., Figler, N. L., Gønlæs, S. L., and Pizzo, S. V. (1990) Alpha-macroglobulin from *Limulus polyphemus* exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system. *Biochemistry* **29**, 10070-10080.
- Esser, A.F. (1991) Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today* **12**:9, 316-318; discussion 321.
- Esser, A. F. (1994) The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* **87**, 229-247.
- Eue, I. (1991) Biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung von Proteinen der Cölomflüssigkeit europäischer Lumbriciden. Dissertation, Greifswald.
- Eue, I., Kauschke, E., and Mohrig, W. (1991) Comparative characterization of lectins in the coelomic fluid of lumbricids. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 75.
- Eue, I., Kauschke, E., and Mohrig, W. (1997) Structural and immunological relationships among earthworm hemolysins and agglutinins. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 119.
- Farries, T. F. and Atkinson, J. P. (1991) Evolution of complement system. *Immunol. Today* **12** (9), 295-300.
- Fearon, D. T. (1997) Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* **388**, 323-324.
- Fehrenbach, F. and Jürgens, D. (1991) Cooperative membran-active (lytic) processes, 187-213. In *Sourcebook of bacterial protein toxins* (ed. Alouf, J. E. and Freer, J. H.) Academic press, London.
- Fernandez, J., Andrews, L., and Mische, S. M. (1994) An improved procedure for enzymatic digestion of polyvinylidene difluoride-bound proteins for internal sequence analysis. *Anal. Biochem.* **218**, 112-117.
- Franceschi, C., Cossarizza, A., Monti, D., and Ottaviani, E. (1991) Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* **21**, 489-493.
- Friemel, H. und Brock, J. (1990) Grundlagen der Immunologie. Akademie-Verlag, Berlin.
- Friemel, H. (1991) Immunologische Arbeitsmethoden (Hrsg. Friemel, H), Fischer, Jena.

Fuji, T. and Murakawa, S. (1981). Immunity in lamprey. III. Occurrence of the complement- like activity. *Dev. Com. Immunol.* **2**, 251-259.

Furst, A., Chien, Y., and Chien, P. (1993) Worms as a substitute for rodents in toxicology: acute toxicity of three nickel compounds. *Toxicol. Meth.* **3**, 19-23.

Füssle, R., Wellensiek, H. J., and Bhakdi, S. (1981) On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus*-toxin. *J. Cell Biol.* **91**, 83-94.

Füssle, R., Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., Sziegoleit, A., and Wellensiek, H. J. (1981) On the mechanism of membrane damage by  $\alpha$ -staphylolysin: isolation of  $\alpha$ -staphylolysin from target membranes and reconstitution into liposomes. *Zbl. Bakt. Suppl.* **10**, 224-234.

Futuyma, D. J. (1990) Evolutionary biology. Sinauer Associates, Sunderland.

Gilbert, W. (1978) Why genes in pieces. *Nature* **271**, 501.

Gigli, I and Austen, K. F. (1971) Phylogeny and function of the complement system. *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 309-332.

Gill, S. S., Singh, G. J. P., and Hornung, J. M. (1987) Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis cytolytic toxins. *Infect.Immun* **55**, 1300-1308

Gilliland, K. M. and Moscatelli, E. A. (1969) Sphingolipids of animal nervous tissue. I. A comparative study of polar lipids sphingosine bases. *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 221-229.

Goetz, P. (1988) Immunreaktion bei Wirbellosen, insbesondere Insekten. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **81**, 113-129.

Gordon, D., Martin-Eauclaire, M. F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R. B., Pelhate, M., and Rochat, H. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J. Bio. Chem.* **271**, 8034-8045.

Grant S. K., Deckman I. C., Culp J. S., Minnich M. D., Brooks I. S., Hensley P., Debouck C., and Meek T. D. (1992) Use of protein unfolding studies to determine the conformational and dimeric stabilities of HIV-1 and SIV proteases. *Biochemistry* **31**, 9491-9501.

- Green, M. H. and Vermeulen, C. W. (1994) Fever and the control of gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* **145**:4, 269-272.
- Griem P. and Gleichmann, E. (1995) Metal ion induced autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **7**(6), 831-838.
- Griem P., Panthel K., Kalbacher H., and Gleichmann E. (1996) Alteration of a model antigen by Au(III) leads to T cell sensitization to cryptic peptides. *Eur. J. Immunol.* **26**(2), 279-287.
- Grönberg, L., Ruan, Z., Bittmann, R., and Slotte, J. P. (1991) Interaction of cholesterol with synthetic sphingomyelin derivatives in mixed monolayers. *Biochemistry* **30**, 10746-10754.
- Haque, A., Sugimoto, N., Horiguchi, Y., Okabe, T., Miyata, T., Iwanaga, S., and Matsuda, M. (1992) Production, purification, and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of *Clostridium botulinum*. *Infect. Immun.* **60**, 71-78.
- Harth, M. (1981) Modulation of immune responses of gold salts. *Agents Actions Suppl.* **8**, 465-476.
- Harvell, C. D. (1990a) The ecology and evolution of inducible defenses. *Q. Rev. Biol.* **65**, 323-340.
- Harvell, C. D. (1990b) The evolution of inducible defence. *Parasitology* **100**, 53-61.
- Hatakeyama, T., Nadatoma, H., and Yamasaki, N. (1995) Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **270**, 3560-3564.
- Hänsch, G. M. (1988) The homologous species restriction of the complement attack: structure and function of the C8 binding protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **140**, 109-118.
- Hayashi, S., Isobe, K., Emi, N., Yokoyama, I., Okada, H., Nakashima, I., and Takagi, H. (1996) Inhibition of human complement-dependent cell lysis by bovine aortic endothelial cells transfected with membrane-bound complement-regulatory factor (DAF and HRF20) gene using a retroviral vector. *Eur. Surg. Res.* **28**, 440-446.
- Hemminga M. A., Sanders J. C., and Spruijt R.B. (1992) Spectroscopy of lipid-protein interactions: structural aspects of two different forms of the coat protein of bacteriophage M13 incorporated in model membranes. *Prog. Lipid Res.* **31**, 301-333.
- Henninger, K. (1990) Untersuchungen zur Beeinflussung der Zellvitalität durch Komponenten der

Coelomflüssigkeit von *Eisenia foetida* (Sav.). Diplomarbeit, Greifswald.

Heukeshoven, J., Dernick, R. and Radola, B. J. (ed.) 1986. Elektrophorese-forum'86. 22-27.

Higgins, R. and Gottschalk, M. (1997) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1996. *Can. Vet. J.* **38**, 302.

Hirigoyenberry, F., Lassalle, F., and Lassegues, M. (1990) Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: transcription and translation regulation of lysozyme and proteins evidenced after bacterial infestation. *Comp. Biochem. Physiol. [B]* **95**, 71-75.

Hori, T., and Sugita, M. (1993) Sphingolipids in lower animals. *Prog. Lipid Res.* **32**, 25-45.

Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T., Adachi, T., and Kim, J. (1992) The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1175-1180.

Horta, M. F. (1997) Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. *Trends Microbiol.* **5**, 363-366.

Hrabe, S. (1983) Evolution of the family Lumbriculidae. Note on the classification of the class Oligochaeta. *Hydrobiologia* **102**, 171-173.

Hristova K., Selsted, M. E., and White, S. H. (1996) Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2. *Biochemistry* **35**, 11888-11894.

Hrzenjak, T., Hrzenjak, M., Kasuba, V. Efenberger-Marinculic, P., and Levanat, S. (1992) A new source of biologically active compounds in earthworm tissue (*Eisenia foetida*, *Lumbricus rubelus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **102**, 441-447.

Hrzenjak, M., Kobrehel, D., Levanat, S., Jurin, M., and Hrzenjak, T. (1993) Mitogenicity of the earthworm's (*Eisenia foetida*) insulin-like proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **104**, 723-729.

Huang, W., Vernon, L. P., Hansen, L. D., and Bell, J. D. (1997) Interactions of thionin from *Pyrularia pubera* with dipalmitoylphosphatidylglycerol large unilamellar vesicles. *Biochemistry* **36**, 2860-2866.

Hubert, F., Cooper, E. L., and Roch, P. (1997) Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochim.*



- Humphreys, T. and Reinherz, E. L. (1994) Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol. Today* **15**, 316-320.
- Ireland, M. P. (1978) Heavy metal binding properties of earthworms chloragosomes. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **29**, 385-394.
- Ishiura, S., Matsuda, K., Koizumi, H., Tsukahara, T., Arahata, K., and Sugita, H. (1990) Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocyte. *Mol. Immunol.* **27**, 803-807.
- Jaenike, J. (1982) "Eisenia foetida" is two biological species. *Megadrilologica* **4**, 6-8.
- Janeway, C. A. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 1-13.
- Jeanteur, D., Pattus, F., and Timmins, P.A. (1994) Membrane-bound form of the pore-forming domain of colicin A. A neutron scattering study. *J. Mol. Biol.* **235**, 898-907.
- Jenne, D. and Stanley, K. K. (1985) Molecular cloning of S-Protein. *EMBO J.* **4**, 3153-3157.
- Jacobs A. A., Loeffen P. L., van den Berg A. J., and Storm P. K. (1994) Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **62**:5, 1742-1748.
- Johansson M. W. and Söderhäll, K. (1996) The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **15**, 46-66.
- Johnson M. K. and Boese-Marrazzo D. (1980) Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **29**, 1028-1033.
- Kägi, D., Seiler, P., Pavlovic, J., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1995) The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3256-3262.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. (1996) Molecular mechanisms of

- lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 207-232.
- Kaiser, H. E. (1993) Comparative aspects of neoplastic invasion of the brain. *J. Neurooncol.* **18**, 163-170.
- Kaminski, H. J., Suarez, J. I., and Ruff, R. L. (1997) Neuromuscular junction physiology in myasthenia gravis: isoforms of the acetylcholine receptor in extraocular muscle and the contribution of sodium channels to the safety factor. *Neurology* **48**, 8-17.
- Kämpfe, L. (Hrsg.) (1985) Evolution und Stammesgeschichte der Organismen, Fischer Verlag, Jena.
- Kaneshiro, E. S. (1987) Lipids of Paramecium. *J. Lipid Res.* **28**, 1241-1258.
- Kapur, R., Evans, D. L., and Harris, D. T. (1994) Evolutionary conservation of a human function-associated molecule on murine natural killer cells: expression and function. *Scand. J. Immunol.* **40**, 50-56.
- Karnovsky, M. (1969) Lipid composition in annelids. In *Chemical Zoology* (ed. Florin, M. and Scheer, B., London and New York) Vol. **IV**, 205-210.
- Kauschke, E. and Mohrig, W. (1987) Cytolytic activity in the coelomic fluid of the annelid *Eisenia foetida* (Sav.) *J. Comp. Physiol.* **157**, 77-83.
- Kauschke, E. and Mohrig, W. (1987) The occurrence of bacterioagglutinating, hemagglutinating and hemolytic compounds in the coelomic fluid of different species of European earthworms (Annelida, Lumbricidae) *Zool. Jb. Physiol.* **91**, 497-477.
- Kauschke, E. and Mohrig, W. (1987) Comparative analysis of the hemolytic and hemagglutinating activities in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris* (Annelidae, Lumbricidae). *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 331-341.
- Kawano, M., Tsunoda, S., Koni, I., Mabuchi, H., Muramoto, H., Yachie, A., and Seki H. (1997) Decreased expression of 20-kD homologous restriction factor (HRF20, CD59) on T lymphocytes in Epstein-Barr virus (EBV)-induced infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.* **108**, 260-265.
- Kem, W. R. (1994) Structure and membrane actions of a marine worm protein cytolsin, Cerebratulus toxin A-III. *Toxicology* **87**, 189-203.
- Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., Hayashi M., Kashiwagi H., Matsumoto, I. and Seno, N. (1990) Diversities in animal vitronectins. Differences in molecular weight, immunoreactivity and

carbohydrate chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1 (**1033**), 49-56.

Klein, J. (1997) Origins of anticipatory immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 77-78.

Koike, C., Isobe, K., Nakashima, I., Okada, H., Hayashi, S., Yokoyama, I., and Takagi, H. (1996) How can human DAF and HRF20 prevent HAR in transgenic mice? *Transplant. Proc.* **28**, 599-600.

Komiyama, K., Yoshimura, M., Iwase, T., Sato, J., Okumura, and Cooper, E. L., and Moro, I. (1997) Identification of perforin gene its protein in the earthworm coelomocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 115.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., De Vos, W. M. (1993) Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* **216**, 281-291.

Lackie, A. M. (ed.) (1986) Immune mechanisms in invertebrate vectors. *Zoological society of London symposia*. Oxford University Press.

Laclette, J. P., Shoemaker, C. B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D, and Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 1 (**148**), 124-128.

Laine, R. O., Morgan, B. P. and Esser, A. F. (1988) Comparison between complement and mellitin hemolysis: anti-mellitin antibodies inhibit complement lysis. *Biochemistry* **27**, 5308-5314.

Lakey, J. H., Massotte, D., Heitz, F., Dasseux, J. L., Faucon, J. F., Parker, M. W., and Pattus, F. (1991) Membrane insertion of the pore-forming domain of colicin A. A spectroscopic study. *Eur. J. Biochem.* **196**, 599-607.

Lange, S., Nuessler, F., Ehlers, D., Kauschke, E., Kraft, R., Kostka, S., Lutsch, G. and Herrmann, A. (1995) Function and regulation of the earthworm hemolysin from *E. f. fetida*. *FEBS Abstract book* (23rd Meeting of the FEBS, Basel) 285.

Lange, S., Kauschke, E., Mohrig, W., Lutsch, G., Cooper, E. L., and Herrmann, A. (1997) Interaction of earthworm hemolysin with pure lipid and biological membranes. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 116.

Langlet, C. and Bierne, J. (1982) Immune characteristics of graft rejection in nemertean of the genus *Lineus*. *Eur. J. Immunol.* **9**, 705-708

Lassalle, F., Lassègues, M., and Roch, P. (1993) Serological evidence and amino acid sequence of ubiquitin-like protein isolated from coelomic fluid and cells of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Comp. Biochem. Physiol.* **104**, 623-628

Lassegues, M., Roch, Ph. and Valembois, P. (1989) Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: evidence, induction and animal protection. *J. Invert. Pathol.* **53**, 1-6.

Lassegues, M., Milochau, A., Doignon, F., Du Pasquier, L., and Valembois, P. (1997) Sequence and expression of an *Eisenia-fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *Eur. J. Biochem.* **246**, 756-762.

Laulan, A., Lestage, J., Bouc, A. M., Chateaufreynaud-Duprat, P. (1988) The phagocytic activity of *Lumbricus terrestris* leukocytes is enhanced by the vertebrate opsonins: IgG and complement C3b fragment. *Dev. Comp. Immunol.* **12**, 269-277

Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R.D. and Müller-Eberhard, H. J. (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7659-7663.

Leippe, M. (1997) Amoebapores. *Parasitol. Today* **13**, 178-183.

Lejeune A., Moorjani M., Gicquaud C., Lacroix J., Poyet P. and Gaudreault R. (1994) Nanoerythroosome, a new derivative of erythrocyte ghost: preparation and antineoplastic potential as drug carrier for daunorubicin. *Anticancer Res.*, **14**(3A), 915-919.

Lejeune, A., Poyet, P., Gaudreault, R. C., and Gicquaud, C. (1997) Nanoerythroosome, a new derivative of erythrocyte ghost. 3. Is phagocytosis involved in the mechanism of action? *Anticancer Res.* **17**, 3599-3603.

Lesieur, C., Vécsey-Semjén, B., Abrami, L., Fivaz, M., and van der Goot, F. (1997) Membrane insertion: The strategies of toxins (review). *Mol. Membr. Biol.* **14**, 45-64.

Lester D., S. and Brumfeld, V (1991) Divalent cation-induced changes in conformation of protein kinase C. *Biophys. Chem.* **39**, 215-224.

Li, J. (1992) Bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 545-556.

Li, J., Koni, P. A., and Ellar, D. J. (1996) Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**,

- Lindner, R. and Bernheimer (1984) Action of bacterial cytotoxins on normal mammalian cells and cells with altered membrane lipid composition. *Toxicon* **4**, 641-651.
- Liu, C. C., Walsh, C. M., and Young, J. D. (1995) Perforin: structure and function. *Immunol. Today* **16**, 194-201.
- Liu, C. C., Persechini, P., and Young, J. (1995) Perforin and lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Immunol. Rev.* **146**, 145-175.
- Lokki, M. L. and Colten, H. R. (1995) Genetic deficiencies of complement. *Ann. Med.* **27**, 451-459.
- Lu, J. H., Thiel, S., Wiedemann, H., Timpl, R., and Reid, K. B. (1990) Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J. Immunol.* **144**, 2287-2294.
- Lublin, D. M. and Atkinson, J. P. (1989) Decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **153**, 123-145.
- Lucius, R. und Loos-Frank, B. (1997) Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin.
- Lüthy, P. (1980) Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**, 1-7.
- Lutz, F., Maurer, M., and Failing, K. (1987) Cytotoxic protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicon* **25**, 293-305.
- Maek, P., Belmonte, G., Pederzoli, C., and Menestrina, G. (1994) Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology* **87**, 205-227.
- Maloney, M. D. and Sempervivo, L. H. (1991) Thin-layer and liquid column chromatographic analyses of the lipids of adult *Onchocerca gibsoni*. *Parasitol. Res.* **77**, 294-300.
- Mangel, A., Leitao, J. M., Batel, R., Zimmermann, H., Müller, W. E. G., and Schröder, H. C. (1992) Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. *Eur.*

- Maraganore, J. M. and Heinrikson, R. L. (1986) The lysine-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* **261**, 4797-4804 [published erratum appears in *J. Biol. Chem.* (1993) 15, 268, 6064]
- Marsh, D. (1981) in *Membrane Spectroscopy* (Grell, E. ed.) pp 51-142. Springer-Verlag, Berlin.
- Masson, D. and Tschopp, J. (1985) Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 9069-9072.
- Mattjus, P. and Slotte, J. P. (1994) Availability for enzyme-catalyzed oxidation of cholesterol in mixed monolayers containing both phosphatidylcholine and sphingomyelin. *Chem. Phys. Lipids* **71**, 73-81.
- Mayer, M. M. (1983) Membran attack by complement. *Adv. Exp. Med. Biol.* **146**, 193-216
- Mazumder, P. K. and Dube, S. N. (1996) Marine toxins as molecular probes for biological interactions: A review. *Indian J. Physiol. Sciences* **50**, 34-47.
- Meer, B. W., Fugate, R. D., and Sims, P.S. (1989) Complement proteins C5b-9 induce transbilayer migration of membrane phospholipids. *Biophys. J.* **56**, 935-946.
- Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Paratcha, G. Azcurra, J.-M., and Florin-Christensen, J. (1995) The molecular basis of the self/nonself selectivity of a coelenterate toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 348-345.
- Menestrina, G., Mackmann, N. and Bhakdi, S. (1987) Escherichia coli hemolysin forms voltage-dependent ion channel in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **905**, 109-117.
- Mercy, P. D. and Ravindranath, M. H. (1993) Purification and characterization of N-glycolyneuraminic-acid-specific lectin from *Scylla serrata*. *Eur. J. Biochem.* **215**, 697-704.
- Milochau, A., Lassegues, M., and Valembois, P. (1997) Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1337**, 123-132.
- Mlinar, B. and Enyeart, J. (1993) Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal

- cations and nickel in neural rat and human cells. *J. Physiol. (Lond.)* **469**, 639-652.
- Moayeri, M. and Welch, R.A. (1997) Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **65**, 2233-2239.
- Moesby, L., Corver, J., Erukulla, R.K., Bittman, R., and Wilschut, J. (1995) Sphingolipids activate membrane fusion of Semliki Forest virus in a stereospecific manner. *Biochemistry* **34**, 10319-10324.
- Mohrig, W., Kauschke, E., and Ehlers, M. (1984) Rosette formation of the coelomocytes of the earthworm *lumbricus terrestris* L. with sheep erythrocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **8**, 471-476.
- Mohrig W., Eue, I., Kauschke, E. and Hennicke, F. (1996) Crossreactivity of hemolytic and hemagglutinating proteins in the coelomic fluid of lumbricidae (Annelida). *Comp. Bioch. Physiol.* **115**, 19-30.
- Mohrig, M., Lange, S., Kauschke, E., Preusse, K., and Cooper, E. L. (1997) Inhibitor controlled hemolytic activity in coelomic fluid of earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 116.
- Monti, D., Salvioli, S., Cossarizza, A., Franceschi, C., and Ottaviani, E. (1992) Cytotoxicity and cell death: studies on molluscan cells and evolutionary considerations. *Acta. Biol. Hung.* **43**, 287-291.
- Moran, O., Zegarra-Moran, O., Virginio, C., Gusmani, L., and Rottini, G. D. (1992) Physical characterization of the pore forming cytolytic from *Gardnerella vaginalis*. *FEMS Microbiol. Immunol.* **5** (1-3), 63-69
- Morgan, B.P. (1995) Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **32**, 265-298.
- Moss, J. and Vaughan, M. (1988) ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **61**, 303-379.
- Müller-Eberhard, H. J. (1986) The membran attack complex of complement. *Ann. Rev. Immun.* **4**, 503-528.
- Müller-Eberhard, H. J. (1988) Molecular organization and funktion of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 321-347
- Nakamura, M., Sekino, N., Iwamoto, M., and Ohno-Iwashita, Y. (1995) Interaction of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolytic, with liposomal membranes: change in the aromatic side chains upon binding and insertion. *Biochemistry* **34**, 6513-6520

- Nakashima, N., Miyazaki, K., Ishikawa, M., Yatohgo, T. Ogawa, H., Uchibori, H., Matsumoto, I., Seno, N., and Hayashi, M. (1992) Vitronectin diversity in evolution but uniformity in ligand binding and size of the core polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 1-10.
- Narat, M., Macek, P., Kotnik, V., and Sedmak, B. (1994) The humoral and cellular immune response to a lipid attenuated pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* **32**, 65-71.
- Nastuk, W. L. (1971) Mechanisms of neuromuscular blockade. *Ann. NY Acad. Sci.* **183**, 171-182.
- Needham, D. and Nunn, R. S. (1990) Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.* **58**, 997-1009.
- Nicholson-Weller, A. and Halperin, J. A. (1993) Membrane signaling by complement C5b-9, the membrane attack complex. *Immunol. Res.* **12**:3, 244-57.
- Nicol, F., Nir, S., and Szoka, F.C. Jr (1996) Effect of cholesterol and charge on pore formation in bilayer vesicles by a pH-sensitive peptide. *Biophys. J.* **71**, 3288-3301.
- Nicolas, P. and Mor, A. (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates, *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 277-304.
- Niedermeyer, W. (1985) Interaction of Streptolysin-O with biomembranes: Kinetic and morphological studies on erythrocyte membranes, *Toxicon* **23**, 425-439.
- Nielsen, K., Rosenbaum, B., Ballinger, R., and Stiller, J. (1984) Effects of various treatments of bovine complement on its lytic efficacy measured by two different tests. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **6**, 273-283.
- Nieva, J. L., Bron, R., Corver, J., and Wilschut, J. (1994) Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *EMBO J.* **13**, 2797-2804.
- Nishimura, K., Suzuki, A., and Kino, H. (1991) Sphingolipids of a cestode *Metroliaesthes coturnix*. *Biochim. Biophys. Acta* **1086**, 141-150.
- Nistiár, F., Janigová, V., Durovicová, J., and Puzová, H. (1991) Purification of alpha-hemolysin in *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* **36**, 395-400.



- O'Callaghan, R. J., Callegan, M. C., Moreau, J. M., Green, L. C., Foster, T. J., Hartford, O. M., Engel, L. S., and Hill J. M. (1997) Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect. Immun.* **65**, 1571-1578.
- Oien, N. and Stenersen, J. (1984) Esterases of earthworms--III. Electrophoresis reveals that *Eisenia fetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* **78**, 277-282.
- Ojcius, D. M. and Young, J. D. (1990) Characterization of the inhibitory effect of lysolipids on perforin-mediated hemolysis. *Mol. Immun.* **27**, 257-261.
- Ojcius, D. M. and Young, J. D. (1991) Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem. Sci.* **6**, 225-229.
- Oka, T., Murata, Y., Nakanishi, T., Yoshizumi, H., Hayashida, H., Ohtsuki, Y., Toyoshima, K., and Hakura, A. (1992) Similarity, in molecular structure and function, between the plant toxin purothionin and the mammalian pore-forming protein. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 707-715.
- Okamura, N., Stoskopf, M., Yamaguchi, H., and Kishimoto, Y. (1985a) Lipid composition of the nervous system of earthworms (*Lumbricus terrestris*). *J. Neurochem* **45**, 1875-1879.
- Okamura, N., Stoskopf, M., Hendricks, F., and Kishimoto, Y. (1985b) Phylogenetic dichotomy of nerve glycosphingolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**, 6779-6782.
- Omodeo, P. (1952) Cariologia dei Lumbricidae. *Caryologia* **4**, 173-275.
- Op den Kamp, J. A. F. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 47-71.
- Osada, M., Ito, T., Matsutani, T., and Mori, K. (1993) Partial purification and characterization of hemolysin from the coelomic fluid of *Strongylocentrotus nudus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **105**, 43-45.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Serra, J. L., da la Cruz, F., and Goni, F. M. (1991). Alpha hemolysin from *E. coli*. Purification and self aggregation properties. *FEBS Letters* **2 (280)**, 195-198.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I. da la Cruz, F., and Goni, F. M. (1993). Release of lipid vesicle components by the bacterial protein toxin alpha-hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta* **1147**, 81-88.
- Ostolaza, H., Bakás, L., and Goni F. M. (1997) Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the

- lysis of model membranes by *E. coli* alpha-haemolysin. *J. Membr. Biol.* **158**, 137-145.
- Ottaviani, E. and Franceschi, C. (1997) The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol. Today* **18**, 169-174.
- Parker, M. W., van der Goot F. G., and Buckley J. T. (1996) Aerolysin--the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol. Microbiol.* **19**, 205-212.
- Parrinello, N., Cammarata, M., Lipari, L., and Arizza, V. (1995) Sphingomyelin inhibition of *Ciona intestinalis* (Tunicata) cytotoxic hemocytes assayed against sheep erythrocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **19**, 31-41.
- Peake P. W., Greenstein J. D., Pussell B. A., and Charlesworth J. A. (1996) The behaviour of human vitronectin in vivo: effects of complement activation, conformation and phosphorylation. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 416-422.
- Peitsch, M., C. and Tschopp, J (1991) Assembly of macromolecular pores by immune defense systems. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3**, 710-716.
- Peter, H. H. (1991) Immunologische Defektsyndrome. In *Immunologie* (ed. Gemsa, D., Kalden, J. R. unbd Resch, K.) Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Peters, W. und Walldorf, V. (1986) Der Regenwurm - *Lumbricus terrestris* L., Quelle und Meyer Verlag, Heidelberg und Wiesbaden.
- Piccoli, R. and D'Alessio, G. (1984) Relationships between nonhyperbolic kinetics and dimeric structure in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **259**, 693-695.
- Podack, E. R., Kolb, W. P, and Müller-Eberhard, H. J. (1978) The C5b6 complex: formation, isolation and inhibition of its activity by lipoprotein and the S-protein of human serum. *J. Immunol.* **120**, 1841-1848.
- Podack, E. R. and Tschopp, J. (1982) Circular polymerization of the ninth component of complement. Ring closure of the tubular complex confers resistance to detergent dissociation and to proteolytic degradation. *J. Biol. Chem.* **257**, 15204-15212
- Podack, E. R., Preissner, K., and Müller-Eberhard, H. J. (1983) Inhibition of C9 polymerization by S-protein. *Immunobiol.* **164**, 149-154.

- Podack, E. R., Hengartner, H., and Lichtenheld, M. G. (1991) A central role for perforin in cytotoxicity? *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 129-157.
- Pomorski, T., Herrmann, A., Zachowski, A., Devaux, F., and Müller, P. (1994) Rapid determination of the transbilayer distribution of NBD-phospholipids in erythrocyte membranes with dithionite. *Mol. Membr. Biol.* **11**, 39-44.
- Porchet-Hennere, E., Dugimont, T. and Fischer, A. (1992) Natural killer cells in a lower invertebrate, *Nereis diversicolor*. *Eur. J. Cell. Biol.* **1** (58), 99-107.
- Preissner, K. P., Podack, E. R., Müller-Eberhard, H. J. (1989) C5b-7, SC5b-8 and SC5b-9 complex of complement: ultrastructure and localization of the S-protein (vitronectin) within the macromolecules. *Eur. J. Immunol.* **19**, 69-75.
- Preissner, K. (1989) The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune system. *Blut* **59**, 419-428.
- Prento, P. (1979) Metals and phosphate in the chloragosomes of *Lumbricus terrestris* and their possible physiological significance. *Cell. Tissue Res.* **196**, 123-34.
- Provencher, S.W. and Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37.
- Pybus, V. and Onderdonk, A. B. (1997) Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* **175**, 406-413.
- Quaglino, D., Cooper, E. L., Salvioli, St., Capri, M., Suzuki, M. M., Ronchetti, I. P., Franceschi, C. and Cossarizza, A. (1996) Earthworm coelomocytes in vitro: cellular features and granuloma formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K 562. *Eur. J. Cell Bio.* **70**, 278-288.
- Ram, J. L., Baidoun, F., Ram, M. L., and Croll, R. P. (1997) Cholinergic and peptidergic regulation of siphon/mantle function in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **117**, 275-282.
- Regan, L. (1995) Protein design: novel metal-binding sites. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 280-285.
- Reid, K. B. M. (1986) Immune system. Complement-like cytotoxicity? *Nature* **322**, 684.

- Reid, K. B. M. (1988) The complement system. in *Molecular Immunology*, ed by Hames & Glover, IRL Press Oxford.
- Reid, K. B. and Turner, M. W. (1994) Mammalian lectins in activation and clearance mechanisms involving the complement system. *Springer Semin. Immunopathol.* **15:4**, 307-326.
- Raftos, D. A., Stillman, D. L., and Cooper, E. L. (1990) In vitro culture of tissue from the tunicate *Styela clava*. *In Vitro* **26**, 922-970.
- Raimondi, F., Kao, J. P., Kaper, J. B., Guandalini, S., and Fasano, A. (1995) Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. *Gastroenterology* **109**, 381-386.
- Ray, S. and Chatterjee, B. P. (1995) Saracin: a lectin from *Saraca indica* seed integument recognizes complex carbohydrates. *Phytochemistry* **40**, 643-649.
- Reis, M., Eschbach-Bludau, M., Iglesias-Wind, M. I., Kupke, T., and Sahl, H. G. (1994) Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene pepI and localization and functional analysis of its gene product. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2876-2883.
- Rieppel, O. C. (1987) Fundamentals of comparative biology. Birkhauser, Basel.
- Robertson, H. D. and Mathews, M. B. (1996) The regulation of the protein kinase PKR by RNA. *Biochimie* **78**, 909-914.
- Robey, F. A. and Liu, T. Y. (1983) Synthesis and use of new spin labeled derivatives of phosphorylcholine in a comparative study of human, dogfish, and *Limulus* C-reactive proteins. *J. Biol. Chem.* **258**, 3895-3900.
- Roch, Ph., Davant, N., and Lassegues, M. (1984) Isolation of agglutinins from lysins in the earthworm coelomic fluid by gel filtration followed by chromatofocusing. *J. Chromatogr.* **290**, 231- 235.
- Roch, Ph. (1979) Protein analysis of earthworm coelomic fluid : 1) polymorphic system of the natural hemolysis of *Eisenia fetida*. *Dev. Com. Immunol.* **4 (3)**, 599-608.
- Roch, P., Valembois, P., Davant, N. and Lassegues, M. (1981) Protein analysis of earthworm coelomic fluid-II. Isolation and biochemical characterization of the *Eisenia fetida andrei* factor (EFAF). *Comp. Biochem. Physiol.* **69**, 829-836.

- Roch, Ph., Valembois, P., Lassegues, M. (1987) Genetic and biochemical polymorphism of earthworm humoral defenses. *Prog. Clin. Biol. Res.* **233**, 91-102
- Roch, Ph., Canicatti, C., and Valembois, P. (1989) Interaction between earthworm hemolysins and sheep red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2 (983)**, 193-198.
- Roch, P., Lassegues, M., and Valembois, P. (1991) Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: III--Relationship within the polymorphic hemolysins. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 27-32.
- Roitt, I. M., Brostoff, J., and Male, D. K. (1995) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Rosales, J., Schie-Guzman, B., Jimenez-Delgadillo, P., Talamas-Rohana, and Matluk, M. R. (1992) Purification and partial characterization of an hemolytic activity from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **23**, 243-248.
- Rosen, F. S. (1974). Complement: ontogeny and phylogeny. *Transplant. Proc.* **6 (1)**, 47-50.
- Rossjohn, J., Buckley, J. T., Hazes, B., Murzin, A. G., Read, R. J., and Parker M. W. (1997) Aerolysin and pertussis toxin share a common receptor-binding domain. *EMBO J.* **16**, 3426-3434.
- Rowe, G. E. and Welch, R. A. (1994) Assays of hemolytic toxins. *Methods Enzymol.* **235**, 657-667.
- Russo, M., Bayley, H., and Toner, M. (1997) Reversible permeabilization of plasma membranes with engineered. *Nature Biotechnology* **15**, 278-2824.
- Sanders, L. C. Wang, C.-S., Walling L. L. and Lord E. M. (1991) A homolog of the substrate adhesion molecule vitronectin occurs in four species of flowering plants. *Plant Cell* **3**, 629-635.
- Satouchi, K., Hirano, K., Sakaguchi, M., Tekehara, H., and Matsuura, F. (1993) Phospholipids from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids* **28**, 837-840.
- Schägger, H. and v. Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schantz E. J. and Johnson E. A. (1992) Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.* **56**, 80-99.

Schatz, M. and van Heel, M. (1990) Invariant classification of molecular views in electron micrographs. *Ultramicroscopy* **32**, 255-264.

Schatz, M., Orlova, E. V., Dube, P., Jäger J., and van Heel M. (1995) Structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin at 30 Å resolution determined using angular reconstitution. *J. Struct. Biol.* **114**, 28-40.

Schieren, G. and Hänsch, G. M. (1993) Membrane-associated proteins regulating the complement system: functions and deficiencies. *Int. Rev. Immunol.* **10**, 87-101.

Schoepe, H., Wieler, L. H., Bauerfeind, R., Schlapp, T., Potschka, H., Hehnen, H. R., and Baljer, G. (1997) Neutralization of hemolytic and mouse lethal activities of *C. perfringens* alpha-toxin need simultaneous blockade of two epitopes by monoclonal antibodies. *Microb. Pathog.* **23**, 1-10.

Schreier, S., Polnaszek, C. F., and Smith, I. C. P. (1978) Spin labels in membranes. Problems in practice. *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 395-436

Schwoch, G. and Passow, H. (1973) Preparation and properties of human erythrocyte ghosts. *Mol. Cell. Biochem.* **2**, 197-218.

Seiffert D. (1997) Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol. Histopathol.* **12**, 787-797.

Sekizawa, Y., Hagiwara, K., Nakajima, T., and Kobayashi, H. (1996) A novel protein, lysenin, that causes contraction of the isolated rat aorta: Its purification from the coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biomed. Res.* **17**, 197-203

Sekizawa, Y., Kubo, T., Kobayashi, H., Nakajima, T., and Natori, S. (1997) Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene* **191**, 97-102.

Sekiya, K., Danbara, H., Yase, K., and Futaesaku, Y. (1996) Electron microscopic evaluation of a two-step theory of pore formation by streptolysin O. *J. Bacteriol.* **178**:23, 6998-7002.

Shin, M. L. and Carney, D. F. (1988) Cytotoxic action and other metabolic consequences of terminal complement proteins. *Prog. Allergy.* **40**, 44-81

Siegers, K. and Entian, K. D. (1995) Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1082-1089.

Siegers, K., Heinzmann, S., and Entian, K. D. (1996) Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 12294-12301.

Sima, P. and Vetvicka, V. (1993) Evolution of immune reactions. *Crit. Rev. Immunol.* **13**, 83-114.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.

Sinkora, M., Bilej, M., Tucková, L., and Romanovsky, A. (1993) A Hemolytic function of opsonizing proteins of earthworm's coelomic fluid. *Cell. Biol. Int.* **10**, 935-939.

Sinkora, M., Bilej, M., Drbal, K., and Tucková, L. (1995) Hemolytic function of opsonin-like molecules in coelomic fluid of earthworms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371**, 341-342.

Slotte, J. P. (1992) Enzyme-catalyzed oxidation of cholesterol in mixed phospholipid monolayers reveals the stoichiometry at which free cholesterol clusters disappear. *Biochemistry* **31**, 5472-5477.

Slotte, J. P., Östmann, A.-L., Kumar, E. R., Bittman, R. (1993) Cholesterol interacts with lactosyl and maltosyl cerebroside but not with glucosyl or galactosyl cerebroside in mixed monolayers. *Biochemistry* **32**, 7886-7892.

Slotte, J. P. (1997) Cholesterol-sphingomyelin interactions in cells--effects on lipid metabolism. *Subcell. Biochem.* **28**, 277-293.

Smaby, J. M., Momsen, M., Kulkarni, V. S., and Brown, R. E. (1996) Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* **35**, 5696-5704.

Smith, L.C. and Davidson, E. H. (1994) The echinoderm immune system. Characters shared with vertebrate immune systems and characters arising later in deuterostome phylogeny. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **712**, 213-226.

Smith, S. A., Nason J., and Croll R. P. (1997) Detection of APGWamide-like immunoreactivity in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Neuropeptides* **31**, 155-165.

Söderhäll, K. (1982) Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* **6**, 601-606.

Song, L., Hobaugh, M., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J. (1996) Structure of *Staphylococcal* alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-1866.

Stanley, K. K. (1988) The molecular mechanism of complement C9 insertion and polymerisation in biological membranes, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **140**, 49-65.

Su, H. R. (1996) S-protein/vitronectin interaction with the C5b and the C8 of the complement membrane attack complex. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **110**, 314-317.

Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1988) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **228**, 815-822.

Suelter, C. H. (1990) A practical guide to enzymology. Fischer, Stuttgart and New York.

Suzuki, M. M. and Cooper, E. L. (1995) Spontaneous cytotoxic earthworm leukocytes kill K562 tumor cells. *Zool. Sci.* **12**, 443-451.

Suzuki, M. M. and Cooper, E. L. (1995) Killing of intrafamilial leukocytes by earthworm effector cells. *Immunol. Lett.* **44**, 45-49.

Suzuki, T. and Riggs, A. F. (1993) Linker chain L1 of earthworm hemoglobin. Structure of gene and protein: homology with low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13548-13555.

Tanaka, R., Miyahara, K., and Noda, N. (1996) Zwitterionic digalactosylceramides from the earthworm, *Pheretima asiatica*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **44**, 1152-1156.

Taylor, P. W. (1992) Complement-mediated killing of susceptible gram-negative bacteria: an elusive mechanism. *Exp. Clin. Immunogenet.* **9**, 48-56.

Tschopp, J., Masson, D., and Stanley, K. K. (1986) Structural/functional similarity between proteins involved in complement and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* **332**, 831-834.

Tschopp, J., Masson, D., and Schäfer, S. (1986) Inhibition of the lytic activity of perforin by lipoproteins. *J.*



*of Immunol.* **137**, 1950-1953.

Tschopp, J., Masson, D., and Peitsch, M. (1987) Molecular mechanisms of C9 polymerization and its inhibition by S-protein. *Complement* **4**, 232-237.

Tschopp, J. and Jongened, C. V. (1988) Cytotoxic T-Lymphocyte mediated cytotoxicity. *Biochemistry* **27**, 2641-2646.

Tschopp, J., Masson, D., Schäfer, S., Reitsch, M. and Preissner, K. T. (1988) The heparin binding domain of S-protein/vitronectin binds to C7, C8 and C9 and perforin from cytolytic T-cells and inhibits their lytic activities. *Biochemistry* **27**, 4103-4109.

Tschopp, J. Schäfer, S., Masson, D., Peitsch, M., Heusser, C. (1989) Phosphorylcholine acts as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* **337**, 272-274

Tschopp, J. and Nabholz, M. (1990) Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T-lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **8**, 279-302.

Tschopp, J. and French, L. E. (1994) Clusterin: modulation of complement function. *Clin. Exp. Immunol. Suppl* **2**, 11-14.

Tsuboi, I., Matsukawa, M., and Sato, N. (1993a) Isolation and characterization of a sialic acid-specific lectin from hemolymph of the Southeast Asian horseshoe crab *Tachypleus gigas*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1237-1242.

Tsuboi, I., Matsukawa, M., Sato, N., and Kimura, S. (1993b) Isolation and characterization of a sialic acid-specific binding lectin from the hemolymph of Asian horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1156**, 255-262.

Tuckova, L., Renjek, J., Sima, P. and Ondrejova, R. (1986). Lytic activities in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Dev. Com. Immunol.* **2** (10), 181-189.

Tuckova, L., Rejnek, J., Bilej, M., and Pospíšil, R. (1991) Characterization of antigen-binding protein in earthworms *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 263-268

Tytler, E., Segrest, J., Epand, R., Nie, S.-Q., Epand, R., Mishra, V. , Venkatachalapathi, Y., and Anantharamaiah, G. M. (1993) Reciprocal effects of apolipoprotein and lytic peptide analogs on membranes. *J. Biol. Chem.* **268**, 22112-22118.

Urich, K. (1990) Vergleichende Biochemie der Tiere. Fischer, Stuttgart, New York.

Vaillier, J., Cadoret, M. A., Roch, P., and Valembois, P. (1985) Protein analysis of earthworm coelomic fluid. III. Isolation and characterization of several bacteriostatic molecules from *Eisenia fetida andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* **1**, 11-20.

Valembois, P., Roch, Ph., Lassegues, M., Cassand, P. (1982) Antibacterial activity of the hemolytic system from the earthworm *Eisenia foetida andrei*. *J. Invert. Pathol.* **40**, 21-29.

Valembois, P., Roch, Ph., Lassegues, M., and Davant, N. (1982) Bacteriostatic activity of a chloragogen cell secretion. *Pedobiologia* **24**, 191-197.

Valembois, P., Lassegues, M., and Roch, P. (1992) Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 95-101.

van der Goot, F. G., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H., and Pattus, F. (1991) A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* **354**, 408-410.

van der Goot, F. G., Lakey, J. H., Pattus, F., Kay, C. M., Sorokine, O., Van Dorsselaar, A., and Buckley, T. (1992) Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* **31**, 8566-8570.

van der Goot, F. G., Ausio, J., Wong, K. R., Pattus, F., and Buckley, J. T. (1993) Dimerization stabilizes the pore-forming toxin aerolysin in solution. *J. Biol. Chem.* **268**, 18272-18279.

van der Goot, F., Buckley, J.T., and Pattus, F. (1994) The pore-forming toxin aerolysin: from the soluble to a transmembrane form. In *NATO ASI series* (Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics), Vol. II **82**, 181-190.

van Heyningen, S. (1976) Binding of ganglioside by the chains of tetanus toxin. *FEBS Lett.* **15**, 5-7.

van Heyningen, S. (1980) Tetanus toxin. *Pharmacol. Ther.* **11**, 141-157.

Varner, J. A., Burger, M. M., and Kaufman, J. F. (1988) Two cell surface proteins bind the sponge *Microciona prolifera* aggregation factor. *J. Biol. Chem.* **263**, 8498-8508.

Vasta, G. R. (1997) The role of lectins in self/non-self recognition and defence in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 138.

Venema, K., Venema, G., and Kok, J. (1995) Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol.* **3**, 299-304.

Versteeg, R. (1992) NK cells and T cells: mirror images? *Immunol. Today* **13**, 244-247.

Vetvicka, V., Sima, P., Cooper, E. L., Bilej, M., and Roch, P. (1994) Immunology of Annelids. CRC Press, Boca Raton, FL.

Vetvicka, V., Sima, P., and Hernychova (1997) Biological activity of coelomic fluid of *Eisenia foetida*. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 114.

Vik, D.P., Munoz-Canoves, P., Chaplin, D. D.; Tack, B. F. (1989) Factor H, *Curr. Top. Immunol. Microbiol.* **153**, 147-162.

Ville, P., Roch, P., Cooper, E. L., Masson, P, Narbonne, J. F. (1995) PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J. Invertebr. Pathol.* **65**, 217-224.

Wake, H. M. (1990) The evolution of integration of biological systems: an evolutionary perspective through studies on cells, tissues, and organs. *Amer. Zool.* **30**, 897-906.

Walker, B., Kasianowicz, J., Krishnasastri, M., and Bayley, H. (1994) A pore-forming protein with a metal-actuated switch. *Protein Eng.* **7**, 655-662.

Weiler, J. M., Edens, R. E., Linhardt, R. J., and Kapelanski, D. P. (1992) Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo. *J. Immunol.* **148**, 3210-3215.

Williams D. P., Wen Z., Watson R. S., Boyd J., Strom T. B., and Murphy J. R. (1990) Cellular processing of the interleukin-2 fusion toxin DAB486-IL-2 and efficient delivery of diphtheria fragment A to the cytosol of target cells requires Arg194. *J. Biol. Chem.* **265**, 20673-20677.

Wojdani, A., Stein, E. A., Lemmi, C.A. and Cooper, E.L. (1982) Agglutinins and proteins in the earthworm,

*Lumbricus terrestris*, before and after injection of erythrocytes, carbohydrates and other materials. *Dev. Comp. Immunol.* **6**, 613-624.

Woodle, M. C., and Papahadjopoulos, D. (1989) Liposome preparation and size characterization. *Methods Enzymol.* **171**, 193-217.

Young, I. D., Cohn, Z. A., and Podack, E. R. (1986) The ninth component of complement and the pore-forming protein (Perforin 1) from cytotoxic T cells: Structural, immunological and functional similarities. *Science* **223**, 184-199.

Young, I. D. and Cohn, Z. A. (1987) Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies, *Adv. Immunol.* **41**, 269-332.

Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **294**, 1-14.

Zalman, L. S., Brothers, M. A., Chin, F. J., and Müller-Eberhard, H. J. (1986) Mechanism of cytotoxicity of human large granular lymphocytes: relationship of the cytotoxic lymphocyte protein to the ninth component (C9) of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5262-5266.

Zalman, L. S., Wood, L. M., and Müller-Eberhard, H. J. (1986) Isolation of a human erythrocyte membrane protein capable of inhibiting expression of homologous complement transmembrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6975-6979.

Zalman, L. S. and Müller-Eberhard, H. (1994) Homologous restriction factor: effect on complement C8 and C9 uptake and lysis. *Mol. Immunol.* **31**, 301-305.

Zenone, T., Souquet, P. J., Cunningham-Rundles, C., and Bernard, J. P. (1996) Hodgkin's disease associated with IgA and IgG subclass deficiency. *J. Intern. Med.* **240**, 99-102.

Zhang, X., Minale, L., Zampella, A., and Smith, C. D. (1997) Microfilament depletion and circumvention of multiple drug resistance by sphinxolides. *Cancer Res* **57**, 3751-3758.

Zhuang P., Blackburn M. N., and Peterson C. B. (1996) Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. I. Biophysical characterization of protein unfolding and multimerization. *J. Biol. Chem.* **271**, 14323-14332.

Ziska, P. and Franz, H. (1981) Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates. *Experientia* **37**, 219.

**Danksagung** Prof. Herrmann danke ich für seine stetige Unterstützung und umfassende, fundierte Hilfe. Seiner ständigen Förderung und wissenschaftlichen Betreuung ist es zu danken, daß die wissenschaftliche Synthese aus angewandter Zoologie, molekularer Biophysik und Immunologie am untersuchten Objekt erfolgreich gelang. Sollte mich mein Werdegang in den Hierarchien nach oben führen, will ich bemüht sein, es ihm in der völligen Abwesenheit von Machtdemonstrationen und menschlicher Wärme gleichzutun. Auch wenn sein Arbeitspensum für mich unerreicht bleiben wird, so werde ich mich bemühen, ihm im Umgang mit anderen Menschen nachzueifern. Außergewöhnlich aktiv und mit großem Eifer und sehr viel Toleranz war Dr. Müller hilfreich zur Stelle, wenn es um große und kleine Probleme des Labors und Probleme persönlicher Natur ging.

Kai Ludwig danke ich für die freundliche und einführende Art, mit der er mich in das Wesen von mathematischen und graphischen Programmen einführte; ich danke ihm für seine stoische Art wie er auf meine frühen Versuche - mit dem Computer umzugehen - reagierte ('that's windows'). Mit seinem Blick für das Wesentliche und mit seiner Nachsicht war er in jeder Beziehung einer der sozialen Ruhepunkte der Arbeitsgruppe. Dr. Frank Nüßler, mit dem ich drei Jahre den Schreibtisch teilte, ohne das zu einem Streit kam, danke ich für die nie abreißende Hilfestellung, die nie in Belehrungen, sondern immer in anspruchsvoller Hilfe mündeten. Herrn Dr. Th. Korte, dessen Denkstrukturen, dem eines Computer wohl sehr nahe sind, danke ich für seine eifrige praktische Hilfe an Meßgeräten, und dafür, daß er nur selten der Versuchung erlag, mir detailliert erklären zu wollen, was bei Tastendruck auf Halbleiterplatten so ganz genau passiert.

Dr. Thomas Pomorski, Jeanette Libera, Uwe Marx, Daniel Wüstner, Britta Schroth-Diez, Bolormaa Baljinnyam und Jürgen Lüneberg danke ich für die erfreuliche Zusammenarbeit. Frau Hillebrecht, Frau Schiller und der Sekretärin Frau Piater sorgten stets für eine sehr angenehme Klima. R. Erlemanns Eifer und regem Interesse sind mehrere entscheidende Messungen zu verdanken. Die gute Zusammenarbeit mit ihm empfand ich als Bereicherung.

Prof. Lucius (HU Berlin) danke ich für gehaltvolle Hinweise und die freundlichen und sehr wertvollen Anregungen für das Abfassen meiner Arbeit. Insbesondere die immunologische Seite der Promotion erfuhr durch seine Unterstützung eine Aufwertung.

Prof. Mohrig (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald) danke ich für sein immerwährendes Interesse an meiner Arbeit; er legte die Basis für mein wissenschaftliches Begreifen. Seine offene und liberale Führung des *Zoologisches Instituts & Museums* gestattete es mir, mich in die Wirbellosenimmunologie einzuarbeiten. Er war der wichtigste 'Kristallisationspunkt' des Institut, der durch unermüdlichen Einsatz eine äußerst angenehme und produktive, wissenschaftliche Atmosphäre schuf.

Dr. Ellen Kauschke führte mich in immunologische und biochemische Arbeitstechniken ein. Ihre freundliche und kritische Begleitung meiner Arbeit waren eine ständige Motivation für mich. Die Ausrichtung der Arbeit auf Bereiche vergleichenden Immunologie ist ihrer souveränen Unterstützung zu danken.

PD Dr. D. Ehlers (E.-M.-A.-Universität) eröffnete mir Einblicke in Techniken der Biochemie; die Anreicherung und spätere Isolierung des Anneliden-Regulators ist seinem chemischen

Sachverstand zu verdanken.

Prof. Cooper (University of California, Los Angeles) danke ich für die angenehme und produktive Zeit im Laboratory of Comparative Immunology.

Den Herren Prof. Müller-Eberhardt und PD Dr. Leippe vom Tropeninstitut der Stadt der Hamburg danke ich für die Gewährung eines Forschungsaufenthaltes im Tropeninstitut. Das ständige, große Interesse und die Unterstützung von PD Dr. Leippe an dem Fortgang meiner Arbeit motivierte und beeindruckte mich nachhaltig.

Prof. Damaschun und Dr. Gast (Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin/Buch) danke ich für die freundliche Unterstützung und Auswertung der CD-Messungen. Dr. Zirwer danke ich für unvergeßliche Momente. Frau Dr. Lutsch (MDC für molekulare Medizin) und Frau Dr. Schauer (E.-M.-A.-Universität) danke ich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Frau Dr. Kraft und Frau Dr. Kostka (MDC) ermöglichten die begonnene Sequenzierung Eiseniaporen. Ihre Unterstützung gestattete den Nachweis tragender Fakten, die für die Aussagekraft der Arbeit unerlässlich waren.

Prof. Götz (FU Berlin) prägte durch anregende Gespräche auf der Insel Hiddensee mein Verständnis der Invertebratenimmunologie. Ich danke ihm für die Möglichkeit, in seinem Labor die Technik der sauren Elektrophorese zu erlernen.

Den Genannten danke ich dafür, daß sie halfen, die Experimente zu konzipieren und Entscheidendes zu deren Auswertung beitrugen.

Reisen wurden von der F.-Naumann-Stiftung und der Heraeus-Stiftung finanziert, viele Geräte und Materialien u.a. von der VW-Stiftung, Thyssen-Stiftung und Sachmitteln der EU, ausgewählte Chemikalien wurden vom Institut de Biologie Physico-Chimique (Paris) zur Verfügung gestellt.

**D**en Doktoranden K. Anders (Berlin) und F. Triebenecker (Stralsund) aus dem Fachbereichen Kulturwissenschaft und Philosophie (HU Berlin) gilt mein Dank für die anregende Gespräche und die Mitarbeit bei der Herausgabe eines Buches und mehrerer Texte über interdisziplinäre Themen. An dieser Stelle sei auch den Zyankrise/Sova Verlag (Berlin, Frankfurt/M.) herzlich gedankt, weniger für das scharf umgrenzte Honorar als vielmehr dafür, daß er uns durch Lesungen und Foren die Möglichkeit der öffentlichen Diskussion gab. Sollte ich nach Jahren der "Regenwurmforschung" noch nicht völlig im Elfenbeinturm angekommen sein, ist es den ständigen Ermunterungen von Herrn Anders und Triebenecker zu danken, über interdisziplinäre Themen nachzudenken. Hier sei auch dem Lamarck-Zirkel der E.-M.-A.-Universität dafür gedankt, daß man mir Möglichkeiten für Vorträge einräumte; die anschließenden Diskussionen haben mein Bild von dem Wechselverhältnis von Biologie und Gesellschaft nachhaltig geprägt. Die vom Lamarck-Zirkel initiierten Naturschutzarbeiten in den Feuchtbiotopen des Nationalparks Vorpommersche Boddenlandschaft waren für mich eine willkommene praktische Ergänzung des biologischen Studiums.

Insbesondere danke ich A. Kuntoff und E. Liebeherr dafür, daß sie Stütze zu jeder Zeit waren, und mich an Tagen der Ausgelassenheit wie an Tagen der Niedergeschlagenheit ertrugen

(“Negative expectations yield negative results. Postive expectations yield negative results.”). Wenn Berlin in der Zeit meiner Promotion eine Heimat sein konnte, war es ihr Verdienst. Josefine Bechstein danke ich für Ihr Interesse.

Meinen Eltern Familie danke ich dafür, das sie den Teil der Bildung und Erziehung, der nicht ‘biologisch vorgegeben’ war, engagiert und mit viel Mühe gestalteten. Sie unterstützten mich jederzeit und ermöglichten mir meinen Bildungsweg. Meinem Bruder danke ich für seine Aufmerksamkeit und uneigennützige Unterstützung.



## Lebenslauf

Name: Sven Lange  
Anschrift: 10115 Berlin, Bergstraße 2  
Alter: 32 Jahre (geb. 30. 09. 1965)  
Geburtsort: Dresden  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: BR Deutschland  
Nationalität: deutsch

## Ausbildung

Schulbildung: 1972 - 1982 Polytechnische Oberschule in Stralsund 1982 - 1984  
Gymnasium in Stralsund

Wehrdienst: 1984 - 1986 Grundwehrdienst in der Armee (18 Monate), Reservedienst 1987  
(September/Oktober)

Studium: 1986 - 1991 Diplompädagogikstudium an der Universität  
Greifswald in der Kombination Biologie/Chemie  
1991 - 1992 Ergänzungsstudium Lehramt Gymnasium (auf Grund der  
Änderung der Prüfungsordnung nach 1989)  
1992 - 1994 Aufbaustudium "Invertebratenimmunologie" und Hilfsassistent am  
Zoologischen Institut der Universität Greifswald

Promotion: 1994 - 1997 Stipendiat der Friedrich-Naumann-Stiftung  
1996 Preisträger der 119. Versammlung deutscher Naturwissenschaftler und  
Ärzte

## Praktika und wissenschaftliche Aufenthalte

Mai - Juli 1986 Assistent im Deutschen Museum für Meereskunde (Stralsund)

Juni - August 1987 Umweltpraktikum in den Masuren (Polen)

1990 - 1991 Schulpraktikum in Stralsund

November 1992 wissenschaftlicher Aufenthalt am Zoologischen Institut der FU Berlin (Prof.  
Götz)

März - April 1993 Forschungsaufenthalt im Tropeninstitut der Stadt Hamburg, Abt. Mole-  
kulare Immunologie (Prof. Müller-Eberhardt, Dr. Leippe)

Dezember 1996 wissenschaftlicher Aufenthalt im Laboratorium für Vergleichende Immunologie,  
Department of Neurobiology, University of California Los Angeles,  
Medical Center, Kalifornien (Prof. Cooper)

1994 - 1997 Zusammenarbeit mit den zum "UNESCO Network for Molecular and Cell  
Biology" gehörenden Laboratorien des "Max-Delbrück-Centrums für  
molekulare Medizin" (Prof. Damaschun, Dr. Zirwer, Dr. Gast, Dr.  
Kraft, Dr. Lutsch, Dr. Eue)

# Publikationen und Tagungsbeiträge

Lange, S. (1991) Hämolytische Faktoren und ihre Regulation bei Annelida und Mammalia. *Internationaler Kongreß für Invertebraten-Immunologie* (Hiddensee). (Vortrag)

Ehlers, D. and Lange, S. (1992) Regulation of the activity of pore forming proteins of annelids and their phylogenetic relationship to cytolytic systems of mammals. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 765.

Herbstagung der Gesellschaft für Biologische Chemie (Rostock)

Lange, S., Nüßler, F., Kauschke, E., and Herrmann, A. (1994) Interaction of hemolysin of earthworm with erythrocyte and phospholipid membranes. *Jahrestagung der Deutschen Biophysikalischen Gesellschaft*, 58.

Jahrestagung der Deutschen Biophysikalischen Gesellschaft (Berlin)

Lange, S., Nuessler, F., Ehlers, D., Kauschke, E., Kraft, R., Kostka, S., Lutsch, G. and Herrmann, A. (1995) Function and regulation of the earthworm hemolysin from *E. f. fetida*. *FEBS Abstract book*, 285.

23<sup>rd</sup> Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (Basel)

Lange, S., Nüßler, F., Kauschke, K., Cooper, E. L., and Herrmann, A. (1997) Interaction of earthworm hemolysin with lipid membranes requires sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **272**, 20884-20892.

Lange, S., Kauschke, E., Mohrig, W., Lutsch, G., Cooper, E. L., and Herrmann, A. (1997) Interaction of earthworm hemolysin with pure lipid and biological membranes. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 116. (Vortrag)  
7<sup>th</sup> Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, Williamsburg (Virginia)

Mohrig, M., Lange, S., Kauschke, E., Preusse, K., and Cooper, E. L. (1997) Inhibitor controlled hemolytic activity in coelomic fluid of earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 116.

7<sup>th</sup> Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, Williamsburg (Virginia)

Lange, S., Kauschke, E., Mohrig, W., Cooper, E. L., and Herrmann, A., A pore forming protein (Eiseniapore) is found in the coelomic fluid of earthworms. (eingereicht, *Eur. J. Biochem.*)

Mohrig, W., Tuckova, L., Preusse, K., Kauschke, E., Rejnek, J., Lange, S., and Cooper, E. L., Inhibitor controlled hemolytic activity in earthworm coelomic fluid. (eingereicht, *J. Exp. Zool.*)

Lange, S., Kauschke, E., Mohrig, W., Hermann, A., and Cooper, E. L., Earthworm pore-forming protein and its regulator are antigenically homologous to complement component C9 and vitronectin. (in Vorbereitung)

*Auswahl interdisziplinärer Titel*

Lange, S. (1993) Von Genen und Genossen. Ein Essay über den Verlust des Biologischen. S. 13-43. In *Das Dederon* (Hrsg. Anders, K., Triebenecker, F., Lange, S. et al., 182 S.) Zyankrise/Sova, Berlin und Frankfurt/Main.

Belke, H. und Lange, S.: Wenn einer mal nur so paraphrasieren will. Über das Verhältnis von Politik und Sprache, Wortunfug und Kommunikationsritualen. *Nordkurier* (3. Juni 1995).

Lange, S. (1996) Hier wendet sich der Geist mit Grausen: Soziobiologie zwischen rechter und linker Ideologie. *PEN* **10**, 12-15.

Lange, S. und Belke, H. Der Kannibalismus. Ist der Mensch, der Menschen ißt, ein Barbar? *Nordkurier* (zum Druck angenommen).

Ich erkläre,  
daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.  
Die verwendete Literatur und andere Hilfsmittel habe ich angegeben.

Sven Lange, Berlin, 30. Januar 1998